

DANIELLE DA CUNHA NASCIMENTO

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIOIDÉRGICO E
SP-ÉRGICO NA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA
PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2006

Nascimento, Danielle da Cunha

Envolvimento do sistema opioidérgico e SP-érgico na hiperalgesia induzida pela privação de sono paradoxal / Danielle da Cunha Nascimento. - São Paulo, 2006.

xiv, 93f

Tese (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Involvement of opioidergic and SP-ergic system on the hyperalgesia induced by paradoxical sleep deprivation

1. Privação de sono paradoxal. 2. Dor 3. Opióides. 4. Taquicininas. 5. Autorradiografia.

DANIELLE DA CUNHA NASCIMENTO

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIOIDÉRGICO E
SP-ÉRGICO NA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA
PRIVAÇÃO DE SONO PARADOXAL

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof Dr Sergio Tufik

Co-orientadora: Profª Drª Monica Levy Andersen

São Paulo
2006

Esta tese de mestrado foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 01/14303-0 (CEPID).

*"Como são difíceis os momentos.
Momentos de decisões,
momentos de escolhas,
momentos de solidão,
momentos a dois,
momentos de partidas,
momentos que em frações de segundos,
decidimos nossos destinos, nossos caminhos.
Momentos que nem sempre estamos equilibrados, lúcidos em tomá-los.
Momentos que se tornarão talvez eternos ou passageiros,
que se tornarão a dúvida ou a certeza,
uma realidade ou um sonho,
uma alegria ou uma lágrima.
Momentos que farão de frações eternos dividendos.
Momentos que nos tornarão heróis ou covardes,
que nos farão amar ou odiar.
Momentos que serão lembranças ou esquecimentos,
serão eternidades ou passagens,
sublimes ou ilusórios.
Momentos de paixão,
momentos de capricho,
momentos de amantes,
momentos de loucuras,
momentos de anseios,
momentos de desejos.
Momentos, momentos...momentos,
Momentos que terei para decidir
Se na minha vida,
aqueles momentos que realmente me tocaram,
aqueles que realmente me fizeram,
valeram ou não um dia terem existido.
Temos que ter a certeza de que todos os nossos momentos
valeram a pena, pelo simples fato de
termos vivido!..."*

(Momentos, Autor desconhecido)

Dedico esta obra especialmente à minha querida mãe, **Maria das Graças da Cunha Nascimento**, por todo amor, empenho e força dedicados a minha criação; assim como, por toda a sua constante confiança em mim e nos meus ideais. Mãe, exemplo de força e determinação, vitoriosa sempre inspirou minha energia de viver e de cuidar.

Ao meu pai **José Ribamar do Nascimento**, irmãos **Patrícia da Cunha Nascimento** e **Raimundo Neyva de Oliveira Paes** e sobrinho **Vytor Daniel Nascimento Paes** pelo amor e felicidade concedidos; e por fazerem parte de minha vida. Família que está dentro do meu coração, sempre ao meu lado em pensamentos e orações.

“Honrar o pai e a mãe não é somente respeitá-los, mas também assisti-los nas suas necessidades; proporcionar-lhes o repouso na velhice; cercá-los de solicitude, como eles fizeram por nós na infância”.

(Alan Kardec, Evangelho segundo o espiritismo)

À minha família em São Paulo, meus irmãos, que tem todo o meu amor, **Marcio Mota e Silva e Sérgio Nogueira de Aguiar** pelo amor, carinho, colo, paz e proteção divididas em todos os dias de nossa convivência e pela eterna amizade. Irmãos que vieram para ficar e que jamais deixarão de ser a minha família.

Às minhas grandes amigas e agradáveis companheiras **Andrea Maculano Esteves, Angelica Kiyomi Saito e Renata Guedes Koyama** pela agradável convivência e sincera amizade ao longo desses anos. Amigas sinceras que dividem todos os momentos seja ele de alegria ou de tristeza, de dificuldade ou de sucesso.

“A amizade é como um navio no horizonte. Nós o vemos, cortando contra o céu, e em seguida ele avança, desaparece de vista, mas isto não significa que não continuará. Essa amizade é linear. Ela se move em todas as direções, nos ensinando sobre nós mesmos e sobre cada um de nós. É por isso que no transcurso de fortes amizades, estaremos presentes um para o outro, mesmo que, nem sempre, estejamos visíveis”.

(Shirley MacLane)

Aos meus orientadores, **Sergio Tufik** e **Monica Levy Andersen**, pelas oportunidades, exemplos e por todos ensinamentos que sempre farão parte de minha vida. Dedico esta obra a vocês, com todo o meu respeito e consideração.

“Se estamos aqui reunidos estou contente. Penso com alegria que tudo quanto escrevi e vivi serviu para nos aproximar. É o primeiro dever do humanista e a fundamental tarefa da inteligência assegurar o conhecimento e o entendimento entre os homens. Bem vale haver lutado e cantado, bem vale haver vivido se o amor me acompanha”.

(Pablo Neruda, De para nacer he nacido)

Agradeço a especialmente à **Marilde Costa** pela convivência, amizade e auxílio em todos os momentos, auxílio fundamental para a conclusão desta etapa. Por ter me acolhido, desde a minha chegada até o último momento. Os meus sinceros agradecimentos.

À **Alice Aparecida, Solange, Tomé Pimentel, Waldemarks Leite (Dunga), Ricardo Marques (Ricardinho), Ivan Xavier e Gilberto de Carvalho.** Todos que estiveram presentes durante esta trajetória e contribuíram de forma direta na realização dos experimentos. Pessoas sempre dispostas a ajudar, contribuíram para que cada dia fosse um dia muito mais tranquilo e agradável. Os meus sinceros agradecimentos.

À **Débora Cristina Hipólide** pela assistência, orientações e ensinamentos, assim como pela revisão dos artigos. Muito obrigada.

Agradeço a **Karin M. Moreira** pela assistência, orientação nos experimentos de autorradiografia, confecção e revisão dos resultados e estatística, e pela agradável convivência, principalmente durante o curso de verão. Muito obrigada por tudo.

À **Diva Maria Lima** pela assistência nos experimentos de autorradiografia. Sinceramente obrigada.

Ao professor **José N. Nóbrega** pela revisão do artigo, orientação e disposição em ajudar. Meu sincero carinho.

Aos **pós-graduandos do departamento** pela convivência e amizade, principalmente durante o curso de verão. Sinceramente obrigada.

A **Francineide Aragão (Fran)** pelo carinho, amizade e conselhos; assim como, por ter estado presente sempre ao meu lado nas dificuldades e sucessos, compartilhando todos os momentos. A você todo o meu amor e carinho.

Ao **Ricardo Borges Machado** pela amizade e convivência. Por ter me acolhido, com todo o carinho, na minha chegada e pelo auxílio em muitos momentos. Muito obrigada meu amigo.

À **Nereide** e **Andréa** da secretaria pela assistência e esclarecimentos. Meus sinceros agradecimentos.

Ao **Geraldo Curi (Jerry)** pela correção do artigo. Muito obrigada.

Ao **Leandro Pimentel (Leo)** por estar sempre disposto a ajudar nos problemas com a informática.

Ao **grupo do sono** pelas críticas e sugestões.

A **todos os meus amigos** que contribuirão direta e indiretamente com sua presença e amizade durante esta minha trajetória. Todo o meu amor.

Aos **animais de experimentação** que contribuem com suas vidas para o progresso e desenvolvimentos científico. Agradeço com todo o meu respeito.

Por fim, ao meu professor **José Ribamar Mesquita Teixeira**, meu pai científico, que contribuiu com toda a base de ensinamentos e lições, fundamentais para que eu pudesse seguir. Meu carinho e saudade.

O homem deve se resignar e suportar os males sem murmurar, se quer progredir.

(Alan Kardec)

Estudos têm demonstrado que sono fragmentado está relacionado à alteração na sensibilidade dolorosa. Acredita-se que a hiperalgesia, induzida pela privação de sono paradoxal (PSP), pode ser devido alterações na transmissão opioidérgica e SP-érgica. Em vista de resultados contraditórios a respeito deste assunto nos propusemos inicialmente a realizar um experimento com o objetivo de observar o efeito longitudinal da PSP na sensibilidade dolorosa, após submeter ratos Wistar a 24, 48, 72 e 96 horas de PSP, seguida de 24 e 48 horas de recuperação de sono em duas diferentes condições, patas secas e úmidas. Após estabelecer este efeito, animais controle (CTRL), PSP 96 horas, bem como animais no período rebote de 24 horas após 96 horas de PSP (REB) receberam salina, morfina, antagonista de neuroquinina 1 (NK1) ou neuroquinina 3 (NK3) e em seguida foram submetidos ao teste da placa quente uma hora após a administração dessas drogas na tentativa de avaliar o limiar de retirada da pata. Ainda realizamos estudo autorradiográfico de receptores com o objetivo de verificar uma possível alteração cerebral de ratos da ligação dos receptores μ -opioides, NK1 e NK3 nos grupos CTRL, PSP e REB. O presente estudo demonstrou que a PSP promoveu mudanças hiperalgésicas na sensibilidade dolorosa, da mesma intensidade, desde as primeiras 24 horas até 96 horas de PSP, e que somente o rebote de sono de 48 horas, após 96 horas de PSP, foi capaz de restaurar a latência para os valores basais. A condição da pata, seca ou úmida, foi de extrema importância para avaliação da latência de retirada na pata após um estímulo térmico, sendo que, o grupo que apresentou patas úmidas no momento do teste demonstrou maiores latências em comparação com aquele com

as patas secas. Somado a isso, quando foi verificado o efeito da privação total de sono de 6 horas na sensibilidade dolorosa, não foi observada nenhuma alteração significativa. Os estudos envolvendo as suposições dos mecanismos pelos quais a PSP promove essas alterações demonstraram que a PSP reduziu o efeito antinociceptivo da morfina, e dos antagonistas NK1 e NK3. No entanto, a possibilidade desse efeito envolver alterações da ligação dos receptores analisados denota que a ligação dos receptores μ -opióides, NK1 e NK3 permaneceram inalterados após a PSP de 96 horas, assim como, durante o período rebote de 24 horas nas áreas analisadas. Nossos dados não permitem excluir a participação do sistema opioidérgico e SP-érgico nesse processo, uma vez que foi observada a redução da atividade analgésica desses compostos após a privação de sono, e até mesmo após o período rebote. Porém conclui que alterações na ligação desses receptores parecem não ser o principal mecanismo.

Previous studies have established a relationship between sleep disruption and pain, and it has been suggested that hyperalgesia induced by paradoxical sleep deprivation (PSD) could be due to a reduction of opioidergic or SP-ergic neurotransmission in the brain. Despite the contradictory results observed until now regarding such effect, in this present study, we conducted initially an experiment in order to evaluate the longitudinal effect of PSD on pain, after submitting animals to 24, 48, 72 and 96 h to PSD followed by 24 or 48 h of sleep recovery in two different conditions, dry and wet paw. Established the PSD effect on pain, rats deprived of sleep for 96 h as well as rats allowed to recover for 24 h after PSD and normal controls received vehicle, morphine, neurokinin 1 (NK1) or neurokinin 3 (NK3) antagonists and were tested on a hotplate one hour later. Quantitative receptor autoradiography was used to map alterations in binding to brain μ -opioid, NK1 and NK3 receptors in separate groups. Results demonstrated that PSD induced a significant reduction in thermal pain threshold equally from 24 to 96 h, as measured by paw withdrawal latencies. This effect did not return to baseline control values after 24 h of sleep recovery, but after 48 h only in 96 h deprived animals. The paw condition was such important because animals with wet paw during the pain evaluation presented higher values of latency than those with dry paw. The usual analgesic effect of morphine was observed in the control group but not in PSD or rebound groups except at the highest dose (10 mg/kg). NK1 antagonist (L-732,138) showed analgesic property by the dose of 10 mg/kg, although PSD antagonized such effect. The treatment with NK3 antagonist (SB218795) after 96 h of PSD did not present the analgesic effect observed in the control group in any doses used. Binding of [3 H]DAMGO to μ sites, [3 H][Sar9.Met(O 2)11]

substance P to NK1 sites and [³H]senktide to NK3 sites did not differ significantly among the three groups in any of the analyzed regions. These results do not exclude the participation of these systems in PSD-induced pain hypersensitivity since sleep-deprived rats were clearly resistant to the used drugs. However, the fact no changes were seen in the binding assay indicates that mechanisms other than altered receptors binding must be sought to explain the phenomenon.

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	01
1. Influência de condições dolorosas no sono em humanos.....	01
2. Influência de condições dolorosas no sono em modelos animais.....	04
3. Influência dos distúrbios de sono na sensibilidade à dor em humanos...	06
4. Influência dos distúrbios do sono na sensibilidade à dor em modelos animais.....	08
5. Inter-relação do ciclo vigília-sono e vias de dor.....	11
JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVO.....	22
MÉTODO.....	23
RESULTADOS.	37
Experimento 1: Caracterização do efeito da privação de sono paradoxal e do rebote de sono sobre o limiar de retirada da pata em ratos.....	37
Experimento 2: Caracterização do efeito da privação total de sono (PTS) e do rebote de sono sobre a latência de retirada da pata em ratos.....	44
Experimento 3: Efeito da morfina do e dos antagonistas NK1, e NK3 e morfina na latência de dor o limiar de retirada da pata em ratos privados de sono paradoxal (PSP) e no período rebote (REB).....	45
Experimento 4: Autorradiografia dos receptores NK1, NK3 e μ -opiídeos, NK1 e NK3 no cérebro de ratos privados de sono paradoxal e no período rebote.	50
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS	94

1. Influência de condições dolorosas no sono em humanos

Distúrbios de sono são comuns em pacientes com dor (Friedrichs, 1997; Morin et al, 1998; Ohayon, 2005). Segundo uma revisão recente de Smith e Haythornthwaite (2004), as dores agudas e crônicas estão lado-a-lado com os distúrbios de sono. Essas dores têm sido relatadas como uma importante causa de insônia. De fato, a maioria dos pacientes com dor crônica sofre de insônia grave, às vezes antes mesmo do início do padrão doloroso propriamente dito, acarretando em um circuito insônia-dor-insônia.

Pacientes com angina noturna e uma variedade de síndromes de dores crônicas apresentaram aumento das latências de sono, do número de episódios de vigília e estágio 1, dos despertares durante à noite, além disso, apresentaram um eletroencefalograma (EEG) com atividade alfa nos estágios de sono de ondas lentas (Moldofsky et al, 1975, 1983, 2001; Moldofsky e Scarisbrick, 1976).

Embora pacientes com dor crônica apresentem dificuldades para o início e manutenção do sono, ainda é obscuro o conhecimento de como a dor causa fragmentação do sono (Moldofsky, 1989). Por exemplo, movimentos periódicos de pernas e alterações emocionais, comuns em pacientes com dor, causam um sono fragmentado, e podem contribuir para um padrão de sono anormal em pacientes com dor crônica (Moldofsky, 2001).

Os autores Lavigne e colaboradores (1991) afirmaram que a interação entre sono, distúrbios de movimentos e algumas dores músculo-esqueléticas são complexas, e podem ser influenciadas por vários fatores psicológicos e/ou biológicos concomitantes. Os autores expressam a dificuldade em saber se é a

dor que induz um sono de baixa eficiência ou o contrário. No mesmo ano, Silva e colaboradores (1991), ao estudarem oito pacientes com dor muscular, encontraram anormalidades do sono caracterizadas por mioclonias noturnas, sono alfa-delta (que se caracteriza pela intrusão de ondas alfa durante o sono profundo), além de anormalidades compatíveis com depressão.

Na mesma linha de investigação, Morin e colaboradores (1998), na tentativa de investigar a prevalência de distúrbios de sono em pacientes com dor crônica e sua relação com distúrbios afetivos, encontraram que 66% dos pacientes que sofriam de dor crônica relatavam distúrbios de sono, no entanto, não houve correlação com distúrbios afetivos.

Considerando que a insônia é o distúrbio de sono mais significativo para muitos indivíduos com dor crônica, Wilson e colaboradores (1998) avaliaram a combinação de diários de sono ao monitoramento da atividade de ambulação por meio de actígrafo. Os resultados demonstram que os sujeitos com dor de maior intensidade relataram também prejuízos de sono mais acentuados que os indivíduos de menor gravidade, embora este fato não tenha sido confirmado pelo actígrafo. Em geral, ambos os métodos de avaliação podem ser indicativos de significância da relação insônia e dor crônica músculo-esquelética, mesmo que o monitoramento da atividade e o auto-relato providenciem informações diferentes (Wilson et al, 1998).

Ao analisarem a complexa relação entre dor de cabeça e distúrbios de sono, Paiva e colaboradores (1997) concluíram que cefaléias matutinas e noturnas são freqüentes indicadores de distúrbio de sono, e sua presença pode justificar a polissonografia. Somado a isso, o tratamento de pacientes com

distúrbios de sono promoveu uma redução da frequência das crises. Neste contexto, Boardman e colaboradores (2005) demonstrou que os distúrbios de sono estão associados a quase todos os tipos e a severidade das cefaléias. No entanto, uma revisão recente de Alberti (2006) indicou que migrânea, cefaléia em salvas e hípica são os tipos mais relacionados aos distúrbios de sono, em contrapartida insônia e apnéia são os distúrbios mais relacionados com as dores de cabeça.

Em um estudo populacional recente, Ohayon (2005) correlaciona algumas condições dolorosas crônicas como a fibromialgia, artrite reumatóide, lombalgias e cefaléias com a presença de insônia na população normal de cinco países europeus; e sugere ainda que existem fatores de associação para essas duas condições. Este autor demonstrou que as condições dolorosas crônicas são freqüentes em mais de 40% da população estudada, e novamente levanta a possível relação bidirecional da dor e sono.

Os distúrbios na manutenção do sono também são encontrados em pacientes com Doença de Parkinson idiopática (74 a 98% dos pacientes com esta doença apresentam distúrbios de sono). Os despertares noturnos observados são freqüentemente causados por dor, rigidez e dificuldade em se virar no leito (Prinz, 1995).

Dos questionários aplicados a 439 mulheres reumáticas hospitalizadas, os resultados indicaram que há uma pequena diferença na prevalência de distúrbio de sono entre reumáticas e não-reumáticas. Os distúrbios de sono foram mais frequentemente observados nas pacientes reumáticas (Leigh et al, 1987). Haythornthwaite e colaboradores (1991) afirmaram que a duração da

queixa de dor está associada ao atraso do início do sono e a uma baixa qualidade de sono.

Drewes e colaboradores (1998) também afirmam a existência das freqüentes queixas de sono em pacientes com artrite reumatóide, assim como acrescentaram que distúrbios de sono podem contribuir para a dor e outras queixas durante o dia. A polissonografia mostra aumento no número de movimentos periódicos de pernas durante o sono, além do aumento da atividade alfa nos estágios de sono de ondas lentas.

2. Influência de condições dolorosas no sono em modelos animais

Apesar da consistência dos dados clínicos, em modelos animais de dor, somente algumas descrições são encontradas (Carli et al, 1987; Andersen e Tufik, 2000, 2003; Schutz et al, 2003, 2004, 2006). A identificação de alterações semelhantes em ratos com dor crônica adicionam informações relevantes ao quadro de distúrbios de sono induzido por dor em seres humanos.

Segundo Landis e colaboradores (1989), ratos com artrite apresentaram sono fragmentado pela manifestação devido a um maior número de episódios de vigília e de sono de baixas amplitudes, entretanto apresentaram episódios mais curtos de sono de maior amplitude tanto durante o período claro como no escuro. Há também redução do sono paradoxal e incapacidade dos ratos artríticos de sustentarem longos períodos de sono. Sendo a gravidade da artrite variável entre os ratos, pode ser possível detectar a relação entre o grau de inflamação que produz dor e as alterações do padrão de sono no

eletroencefalograma (Landis et al, 1989). Em outro estudo, Andersen e Tufik (2000) observaram que além dos distúrbios de sono nos ratos artríticos, há uma marcante redução do limiar de dor frente a diversos estímulos.

Ao estudarem a correlação entre desaferentação, automutilação, atividade rítmica neuronal e modificações do padrão de sono em ratos, Lombard e colaboradores (1984) obtiveram um leve aumento da duração da vigília após a desaferentação (secção das raízes dorsais) em todos os animais. Os ratos com graves automutilações exibiram um sono de ondas lentas fragmentado.

Em relação aos estudos envolvendo injúria a nervos, ratos com constrição do nervo ciático apresentam redução da eficiência de sono, aumento da latência para o início do sono e do número de despertares do 2º ao 10º dia após a lesão do nervo (Andersen e Tufik, 2003).

Em outros animais, interrelação dor e sono também são estudados. Carli e colaboradores (1987), ao verificarem a hipótese de modificações do sono e parâmetros de dor em condições de estimulação nociceptiva persistente de gatos, concluíram que a quantidade de sono depende do débito de sono e do nível da intensidade de dor.

Além disso, Brentegani e colaboradores (1992) submeteram cobaias à estimulação nociceptiva sobre a polpa dental dos incisivos superiores após aplicação local de serotonina (5-HT) no óbex. Os resultados mostraram que a estimulação elétrica é capaz de manter o animal em estado de vigília e em excitação, e os autores sugerem que o sistema trigeminal provavelmente age sobre os centros reguladores de sono. Schutz e colaboradores (2003, 2004,

2006) descreveram os efeitos da dor orofacial sobre o padrão de sono em ratos. Os distúrbios de sono observados foram revertidos pela administração oral de indometacina e inibidor da síntese de óxido nítrico e ciclooxygenase 2.

3. Influência dos distúrbios de sono na sensibilidade à dor em seres humanos

Embora alguns estudos claramente evidenciem que a interação de condições dolorosas com distúrbios de sono pareça ser pertinente, há poucos estudos sobre a influência desses distúrbios sobre a sensibilidade dolorosa. Moldofsky e colaboradores (1975, 1976) foram os pioneiros na realização de experimentos os quais demonstraram que a privação de sono paradoxal promove sintomas dolorosos músculo-esqueléticos. Esses autores iniciaram os estudos após as suposições de que pacientes fibromiálgicas apresentam um sono não-reparador pela presença do padrão alfa-delta no sono, associado à queixas dolorosas. Com esses estudos, os autores puderam dar início a uma linha de pesquisa direcionada a elucidar quais alterações inicia-se primeiramente, se foi o distúrbio de sono que causou as queixas dolorosas, ou a dor que promovia o distúrbio de sono, que por si só mantinha a dor no dia subsequente.

O padrão alfa-delta é encontrado também em pacientes com outras patologias dolorosas como a artrite reumatóide (Drewes et al, 1998), fato que reforça a hipótese de que o sono fragmentado causado pela dor facilita a dor subsequente. Entretanto, não se pode afirmar qual é o fator causador, o sono alterado ou o padrão doloroso. Nesse contexto, já é bem definida a

participação do sono fragmentado em sujeitos normais que apresentam queixas dolorosas e/ou alteração da sensibilidade à dor. Após um estudo em voluntários normais, Agargun e colaboradores (1999) encontraram uma correlação negativa entre a qualidade de sono, avaliado pelo índice de qualidade de sono de Pittsburg, e a sensibilidade à dor. Esses autores observaram que quanto maior a qualidade do sono menor foi a resposta a dor e vice-versa.

Poucos estudos com manipulações experimentais em seres humanos seguiram aos estudos de Moldofsky e colaboradores (1975). Apesar de alguns desses mostrarem resultados contraditórios (Drewes et al, 1998; Older et al, 1998, Arima et al, 2001), a maioria demonstra de que a privação total de sono, e principalmente de sono de ondas lentas, era capaz de promover alteração hiperalgésica (Lentz et al, 1999; Onen et al, 2001a; Kundermann, 2004ab), assim como aumentar a resposta inflamatória cutânea em voluntários normais (Lentz et al, 1999).

Onen e colaboradores (2001a) observando também o período rebote, tanto após privação de sono de ondas lentas como de sono paradoxal, encontrou que apenas após o rebote de sono de ondas lentas pôde ser observado o aumento do limiar de dor em voluntários normais (Onen et al, 2001a). Neste contexto, é importante ressaltar um recente estudo de Kundermann e colaboradores (2004b) que relataram que um período de privação total de sono não alterou o limiar de dor a estímulos térmicos não-nocivos, apesar dos autores terem observado previamente o efeito hiperalgésico da privação de sono após estímulos térmicos nocivos.

Em síntese, os estudos em seres humanos indicam que o termo alteração hiperalgésica não é utilizado para descrever um estado fisiopatológico, mas a direção da mudança na sensibilidade dolorosa após um sono perturbado. A privação de sono de ondas lentas parece exercer este efeito, enquanto resultados com o efeito da privação seletiva de sono paradoxal permanecem ainda incertos, apesar de estudos recentes indicarem também a participação desta fase do sono. O mais recente desses foi o estudo de Roehrs e colaboradores (2006), no qual os autores demonstraram que, poucas horas de privação seletiva de sono paradoxal foram capazes de promover alteração hiperalgésica. Nesse sentido, é importante também ressaltar a existência de dados preliminares de uma relação entre a variação individual no sono paradoxal e o processo de modulação da dor (Smith et al, 2005). Esses autores mostraram que pacientes com maiores latências para o início de sono paradoxal e menor quantidade de sono apresentavam um menor limiar de dor.

4. Influência dos distúrbios do sono na sensibilidade à dor em modelos animais

Essa relação entre a privação de sono paradoxal e a latência de dor para diversos estímulos tem sido melhor estudada em alguns experimentos com ratos desde a década de 70 (Hicks et al 1978, 1979; Ukponmwan et al, 1984, 1986a; Onen et al, 2000, 2001b). Hicks e colaboradores (1978) conduziram experimentos pioneiros com animais demonstrando o efeito da privação de sono na nocicepção. Esses autores utilizaram ratas Sprague-Dawley que foram submetidas à privação de sono paradoxal por três dias,

tendo então seu limiar de dor avaliado por intermédio do limiar de retirada da cauda após um estímulo nocivo elétrico. Esses dados evidenciaram que a privação de sono paradoxal em ratos conduzia a uma redução do limiar de dor desde o primeiro dia de privação de sono.

Em seguida, um segundo estudo dos mesmos autores confirmaram esse mesmo efeito da privação de sono (Hicks et al, 1979). No entanto, eles observaram também a resposta de animais à estímulos dolorosos no período rebote de sono. A alteração do limiar de dor causado pela privação de sono de sono paradoxal só retornou aos valores basais apenas após 96 horas de rebote de sono, demonstrando uma persistência das alterações mesmo após o rebote.

Onen e colaboradores (2000) acrescentaram resultados corroborando com os dados de Hicks e colaboradores (1978) quanto ao efeito da privação de sono no limiar de dor. No entanto, no que se refere ao período rebote, eles demonstraram que o rebote de sono de apenas 24 horas, após a privação de sono paradoxal, foi suficiente para aumentar a latência de retirada da pata, após um estímulo mecânico, para os valores basais. Esses mesmos autores encontraram aumento das manifestações comportamentais de dor não só para o estímulo mecânico, mas também para os estímulos térmico e elétrico, após um período de 72 horas de privação de sono paradoxal (Onen et al, 2001a). Neste estudo, Onen e colaboradores (2001a) avaliaram a sensibilidade dolorosa, após três dias de privação de sono, utilizando uma variedade de estímulos nocivos como pressão na pata, imersão em água quente, choque elétrico na cauda e teste de formalina em ratos. Os animais privados de sono paradoxal apresentaram redução do limiar de dor para os estímulos térmicos,

mecânico e elétrico, entretanto, não apresentaram alteração para estímulo químico, avaliado pelo teste da formalina injetada na pata, que indica que não parece haver alteração na resposta inflamatória.

Apesar dessas evidências de que a privação de sono promove alteração na sensibilidade dolorosa, deve-se ressaltar a existência de dois estudos que não estão de acordo com os resultados encontrados até o momento. Inicialmente, Asakura e colaboradores (1992) analisando os efeitos da privação de sono paradoxal no limiar de retirada da pata, após estímulo térmico em camundongos, não encontraram qualquer alteração após 48 horas de privação de sono, dado que contrasta com quase todos os demais estudos.

O segundo estudo de Dametto e colaboradores (2002) investigaram os efeitos da privação de sono paradoxal no desempenho em diferentes testes de condicionamento, avaliaram a sensibilidade ao choque como uma co-variável na avaliação do aprendizado, uma vez que o teste envolvia choque como fator condicionante. Este estudo encontrou uma maior latência de retirada da pata, após 96 horas de privação de sono paradoxal pelo método da plataforma múltipla modificada, a qual permite o contato social entre os animais. Esses dados sugerem, contraditoriamente, que a privação de sono paradoxal promoveu uma menor sensibilidade à dor, ou seja, analgesia; não corroborando com os outros estudos que demonstraram um efeito hiperalgésico da privação de sono paradoxal.

Em conjunto, a maioria dos estudos até hoje conduzidos sugere o efeito hiperalgésico da privação de sono paradoxal. Porém, ainda permanece controverso, o tempo de privação de sono suficiente para causar a alteração na

sensibilidade à dor, assim como, o tempo de rebote suficiente para retornar a latência para os valores basais, e também qual o tipo de privação de sono, se parcial ou total, responsável por esse fenômeno. Somado a isso, os mecanismos pelos quais essa relação existe ainda permanecem inexplorados.

5. Inter-relação do ciclo vigília-sono e vias de dor

Basbaum e Fields (1978) propuseram um modelo para explicar a modulação da dor baseado em projeções descendentes do cérebro, através do tronco cerebral para a medula espinhal. Este modelo propõe que muitas regiões cerebrais e do tronco encefálico, principalmente hipotálamo, tálamo, área pré-optica medial, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo parabraquial pontino, se interconectam com o núcleo magno da rafe (NMR), de onde partem projeções para o corno dorsal da medula espinhal, mediando, assim, a resposta à dor. O NMR faz parte do complexo núcleo da rafe (NR) no tronco cerebral, e tem sido envolvido não somente na regulação da dor, mas também na termorregulação, controle vasomotor assim como na regulação do ciclo vigília-sono (Basbaum e Fields, 1978).

Em vista disso, Reynolds (1969) demonstrou que animais, após receberem microestimulação em áreas próximas a PAG, toleravam uma incisão abdominal sem anestesia, no entanto, continuavam sensíveis a estímulos visuais e auditivos. Esses dados são embasados pelo fato de pacientes, com dor intratável, apresentam analgesia após estimulação da PAG (Young et al, 1985).

A estimulação de áreas no próprio NR promove o mesmo efeito de estimulação da PAG, dado que demonstra que essas áreas estão interconectadas, sendo assim susceptíveis à estimulação da PAG. A partir do NMR saem fibras que se projetam para o corno dorsal da medula espinhal, onde promovem um efeito inibitório sobre o processamento nociceptivo, inibindo assim, as células do corno dorsal que recebem sinais dos neurônios aferentes nociceptivos, culminando com analgesia (Basbaum e Fields, 1978). Esses dados demonstram que o controle inibitório da dor é um sistema complexo que envolve todas as áreas citadas, sendo importante destacar, que este sistema é ativado principalmente pela administração exógena ou a liberação endógena de opióides.

Dois tipos fisiológicos de células “ON” e “OFF” são observadas no NR e estão envolvidas na regulação da dor. Essas células são tanto serotoninérgicas, como de outras variedades de neuropeptídeos, como substância P e hormônio liberador de tireotrofina. Entretanto, a presença de peptídeos e receptores opióides corrobora para o fato de que, a função neuronal nesta região pode ser mediada também por ativação opióide na modulação da dor (Mason, 2001; Foo e Mason, 2003).

Células OFF são células cuja ativação promove um efeito inibitório descendente na transmissão da dor, ou seja, analgesia. A inibição dessas células é necessária para a resposta motora após um estímulo nocivo (Mason, 2001). Estudos subseqüentes observaram disparos contínuos dessas células após doses analgésicas de agonista μ -opióide serem administradas (Heinricher et al, 1992).

Embora seja difícil distinguir a função de modulação das células ON em relação às células OFF, as células ON parecem ser facilitatórias da transmissão dolorosa, ser ativadas após um estímulo nocivo (Bederson et al, 1990) e também inibidas pela estimulação opióide (Heinricher et al, 1992; Mason, 2001).

Estudos de Bederson e colaboradores (1990) demonstram que a frequência de disparo de células ON é inversamente proporcional à latência de retirada da cauda no teste do “tail flick”, ou seja, são mais ativadas quando maior a presença do estímulo nocivo. Entretanto, neste estudo, as células OFF permaneceram inativas tanto no grupo basal quanto no grupo hiperalgésico. A hiperalgesia, neste estudo, havia sido promovida pela retirada da morfina após tratamento crônico.

A morfina administrada em doses altas e em longo período promove, após sua retirada, principalmente após a utilização de naloxona, aumento da resposta a estímulos nocivos, ou seja, hiperalgesia; sendo relacionada não com as células OFF, mas com a ativação persistente de células ON no NR (Kaplan e Fields, 1991).

A hipótese na qual, a interrupção do sono promove alteração na sensibilidade dolorosa, encontra base na semelhança anatômica dessas regiões envolvidas na modulação da dor, com regiões associadas à geração e a manutenção do sono, implicando um substrato neurobiológico para esta relação. A PAG é conhecida não só por estar envolvida na produção de analgesia, mas também na modulação dos estágios do sono (Sastre et al, 1996), assim como tálamo (Sforza et al, 1995), locus cerúleo (Shouse e Siegel,

1992) e NR (Adrien et al, 1977) apresentam importante papel na regulação do ciclo vigília-sono. Entretanto, os mecanismos envolvidos na redução da latência de dor causada pela privação de sono paradoxal ainda permanecem desconhecidos. As suposições envolvem também alterações em diversos sistemas neuroquímicos, entre eles o sistema opioide (Ukponmwan et al, 1984, 1986).

Historicamente, o sistema opioide tem sido envolvido na modulação da dor (Prezewelocki, 1984). Alguns grupos têm demonstrado que estímulos nocivos promovem alteração de receptores opiáceos, nas áreas relacionadas a dor (Zubieta et al, 2001; Bencherif et al, 2002; Sprenger et al, 2006). Tais alterações poderiam ter uma função importante na relação dor e sono, sendo consistentes com a hipótese de que, animais submetidos à privação de sono paradoxal poderiam ter uma menor resposta do sistema opioide, também em áreas relacionadas à modulação nociceptiva (Ukponmwan et al, 1984, 1986).

Essa relação do sistema opioide com a privação de sono foi também demonstrada por King e colaboradores (1981). Esses autores mostraram que, tanto a administração de beta-endorfina quanto a administração de morfina produziram insônia, com redução importante da quantidade do sono de ondas lentas e supressão total do sono paradoxal. Entretanto, o pré-tratamento com naloxona reverteu a diminuição do sono de ondas lentas, mas não os efeitos da privação de sono paradoxal. Esse relato é seguido por outro estudo que demonstrou um aumento nas concentrações de

beta-endorfina no sangue, assim como, uma pequena diminuição na região hipotalâmica de ratos privados de sono paradoxal (Przewlocka et al, 1986).

O principal estudo que relaciona o sistema opioide como possível responsável para o efeito da privação de sono paradoxal na sensibilidade à dor é o estudo de Fadda e colaboradores (1991), os quais demonstraram uma redução dos receptores opioides no sistema límbico de animais privados de sono paradoxal. De acordo com estudos de Manning (1998), a ativação da amígdala e de outras regiões do sistema límbico modula a resposta nociceptiva possivelmente por meio de conexões diretas com a PAG, sendo os opioides endógenos importantes na modulação da dor nessas regiões (Manning, 1998). Animais com uma possível diminuição dessa ativação, devido à redução de receptores opioides, poderiam apresentar uma redução no sistema descendente de inibição a dor, ou seja, hiperalgesia.

Um inibidor de encefalinase, a fosforamidona, produziu efeito analgésico em ratos que tiveram sono normal, no entanto, 96 horas de privação de sono paradoxal reduziu o limiar de retirada da pata após um estímulo mecânico nocivo e aboliu o efeito analgésico da fosforamidona (Ukponmwan et al, 1984, 1986a). Esses autores encontraram resultados similares com a morfina. Essa similaridade sugere que a quantidade normal de sono paradoxal deve ser importante para a atividade analgésica de opioides endógenos e exógenos (Onen et al, 2000). Animais privados de sono paradoxal parecem apresentar uma diminuição da atividade de peptídeos, como opioides endógenos (Shapiro e Girdwood, 1981).

Tanto a analgesia produzida pela morfina (Berbehani et al, 1979) quanto a hiperalgesia produzida pela retirada de opióides (Kaplan e Fields, 1991) são reduzidas pela inativação do NR. Neste estudo a morfina foi capaz de inibir o disparo de células ON, no entanto, apenas em animais anestesiados. Contraditoriamente, Martin e colaboradores (1992) encontraram que animais acordados também tinham suas células ON inibidas pela administração de morfina. Esse fato sugere que outras regiões também podem estar envolvidas neste processo, não apenas o sistema límbico e a PAG.

A complexidade desse mecanismo é demonstrada por evidências as quais indicam que a atividade do sistema opioide pode ser mediada por diversos outros sistemas, como por intermédio dos receptores da substância P (sistema SP-érgico), uma vez que animais *knockout* de receptores neuroquinina 1 (NK1) da substância P são insensíveis aos efeitos dos opióides (Murtra et al, 2000; Ripley et al, 2002).

A substância P faz parte da família de peptídeos, chamada taquicinas, e é a neurocinina mais abundante no sistema nervoso central de mamíferos (Kramer et al, 1998). A ação biológica das taquicinas é mediada por três subtipos de receptores, pertencentes à família dos receptores ligados à proteína G, denominados NK1, NK2 e NK3 (Guard e Watson, 1991). A substância P tem alta afinidade pelos receptores NK1, mas esta seletividade é relativamente baixa e é possível que, em algumas condições fisiológicas, a ação desta substância possam ser mediadas pela ativação de mais de um tipo de receptor (Rupniak, 1993; Gitter et al, 1995; Longmore et al, 1997)

O sistema SP-érgico tem sido implicado na regulação de uma variedade de funções fisiológicas. Entre outras, está envolvido na inflamação neurogênica (Kingery et al, 2003), distúrbios afetivos (Lieb et al, 2002), distúrbios de sono (Lieb et al, 2002; Andersen et al, 2006) e transmissão da dor (Pernow, 1983; Nakanishi, 1991; Maggi et al, 1993; Otsuka e Yoshioka, 1993); bem como, foi implicada como mediador na fisiopatologia de doenças que associam esses diversos eventos citados, como a fibromialgia, enxaqueca, depressão e ansiedade (Vaeroy et al, 1988; Russell et al, 1994; Longmore, 1997).

Diversos estudos têm dado enfoque a participação da substância P e seus receptores no processo de nocicepção (Nakanishi, 1991; Maggi et al, 1993; Otsuka e Yoshioka, 1993). Experimentos com animais *knockout* indicam que a substância P, via receptor NK1, está envolvida com a diminuição do limiar de dor, por ativação de neurônios nociceptivos na medula espinhal, promovendo assim, hiperexcitabilidade central e aumento da sensibilidade a dor (Xu et al, 1992; Laird et al, 1993, 2000; Ma e Woolf, 1995).

Lecci e colaboradores (1991) demonstram uma redução do limiar de retirada da pata na laca quente após a administração central de substância P, entretanto, a administração de CP 96,345, uma antagonista NK1, reverteu esse efeito aumentando a resposta nociceptiva nesse teste. Esses achados indicam uma participação da substância P, via receptor NK1, no mecanismo de nocicepção térmica.

Diversos outros estudos com animais evidenciaram a participação dos receptores NK1 na produção de hiperalgesia. Field e colaboradores (1998), ao estudarem a participação dos receptores NK1 na hiperalgesia induzida por

estreptazotocin, uma droga indutora de diabetes em animais, encontraram que, em doses regulares, o CI-1021 (antagonista dos receptores NK1/NK2) antagonizou a hiperalgesia por meio, principalmente, dos receptores NK1, e não dos receptores NK2. Semelhante a este achado, McLeod e colaboradores (1999) demonstraram que animais transgênicos, que tinham aumento da expressão de substância P, apresentavam alodínea e hiperalgesia, as quais eram revertidas com o uso de antagonista NK1.

Estudos recentes inferem que não apenas os receptores NK1, mas também os receptores NK3, apresentam uma função importante no processamento da dor, e que os receptores NK2 parecem não participar desse processo (Gaudreau e Plourde, 2003). Nesse estudo, Gaudreau e Plourde (2003) observaram uma diminuição da hipersensibilidade visceral após a administração de antagonista NK3.

Esses receptores são também encontrados no corno dorsal da medula espinhal e tem sua expressão aumentada durante a nocicepção induzida pela injeção de adjuvante de Freund (Zaratin et al, 2000). Nesse estudo, os autores observaram uma redução da hiperalgesia térmica, após a administração de antagonista NK3, sugerindo que o receptor NK3 apresenta uma função no mecanismo de percepção dolorosa.

Evidenciada essa relação dos receptores da substância P com a transmissão dolorosa, podem ser observados os dados que demonstram uma elevação dos níveis de substância P no líquido cefalorraquidiano de pacientes com fibromialgia em comparação com indivíduos saudáveis (Vaeroy et al, 1988; Russel et al, 1992). O aumento da produção de neurotransmissores no

sistema nervoso central pode ser detectado pelo aumento dos seus níveis no líquido cefalorraquidiano (Tsigos et al, 1993), indicando o envolvimento da substância P com a sintomatologia dessa condição clínica, que envolve principalmente, distúrbios afetivos, dor e distúrbios de sono.

Em relação ao envolvimento do sistema SP-érgico com o ciclo vigília-sono, Lieb e colaboradores (2001) estudaram os efeitos da substância P no sono de seres humanos, e constataram que a administração de substância P promovia alterações polissonográficas como a diminuição da eficiência do sono, aumento do sono superficial na primeira metade da noite e aumento do número de despertares. Esses autores discutem a possibilidade desses efeitos serem devido aos efeitos periféricos da substância P.

A provável relevância da substância P nesta patologia em seres humanos poderia ser esclarecida mediante a proposição de um modelo animal que implicasse a substância P como o fator etiológico principal para a sensibilização central e produção de alterações no sono (Xu et al, 1992).

Sendo assim, em um estudo sobre o envolvimento da substância P no ciclo vigília-sono em camundongos, Andersen e colaboradores (2006) demonstraram que a administração intracerebroventricular de substância P promoveu alterações do padrão de sono, como diminuição da eficiência de sono, do tempo total de sono de ondas lentas e de sono paradoxal; aumento da latência para o início de sono e para o primeiro episódio de sono paradoxal; e ainda, aumento do tempo total de vigília e do número de despertares durante o período claro que caracteriza o período predominante de sono do animal. Os dados comportamentais mostraram que a dose utilizada de substância P, não

reduziu a latência para retirada das patas frente ao estímulo térmico, e não induziu nos animais comportamentos indicativos de nocicepção, como *scratching*, indicando que a dose utilizada de substância P não ativou os mecanismos envolvidos em processos dolorosos, mas que causou por si só os distúrbios de sono. Assim, os distúrbios de sono, encontrados no grupo administrado com a mesma dose de substância P, foram provavelmente decorrentes da ação direta desta droga no sistema vigília-sono; principalmente pelo fato destes serem antagonizados pela utilização prévia de antagonista dos receptores NK1.

Nesse contexto, considerada a relevância dos distúrbios de sono na atualidade, e de sua grande relação com patologias dolorosas, as quais parecem apresentar um tratamento ineficiente após um período de privação de sono, constante nesses pacientes (Smith et al, 2004); se insere a necessidade de estudos direcionados a investigar os mecanismos responsáveis por promover hiperalgesia em modelos animais, após a privação de sono paradoxal, como forma de melhor compreender os mecanismos envolvidos na relação entre dor e sono, que possa contribuir para o tratamento de pacientes com dor. Sendo assim, nos propusemos a estudar os mecanismos pelos quais a privação de sono paradoxal promove hiperalgesia em ratos, inicialmente por meio de observação do efeito longitudinal da privação de sono paradoxal e da manipulação farmacológica com morfina, antagonistas NK1 e NK3, assim como por meio do estudo autorradiográfico dos receptores μ -opióides, NK1 e NK3.

A influência dos distúrbios de sono sobre a sensibilidade dolorosa é ainda pouco investigada. É esperado que condições patológicas e/ou tratamentos farmacológicos, acompanhados por uma redução na quantidade de sono paradoxal, possam induzir hiperalgesia e reduzir a efetividade terapêutica de alguns compostos analgésicos, como os opióides, e prejudicar o tratamento de dores crônicas. Nos propusemos realizar esse estudo para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais a privação de sono paradoxal promove alteração hiperalgésica visto que atualmente a privação de sono é muito prevalente em nosso meio.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi investigar a participação do sistema opioide e SP-érgico no aumento da sensibilidade dolorosa observada em ratos privados de sono paradoxal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar os efeitos da privação de sono paradoxal e do período rebote de sono sobre a sensibilidade dolorosa frente ao estímulo térmico.
2. Investigar a participação do sistema opioide na mediação da hiperalgesia induzida pela privação de sono paradoxal.
3. Investigar a participação dos receptores NK1 e NK3 da substância P nos mecanismos pelos quais a privação de sono paradoxal altera a sensibilidade dolorosa.
4. Analisar o efeito da morfina e dos antagonistas dos receptores NK1 e NK3 da substância P na sensibilidade dolorosa em ratos privados de sono paradoxal.
5. Avaliar a distribuição dos receptores μ -opioides, NK1 e NK3 em ratos, assim como uma possível alteração após privação de sono paradoxal.

AMOSTRA

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar do sexo masculino (400-500g de peso) de 90 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Durante todo o estudo foram mantidas condições de luz (fase clara das 7 às 19 horas) e temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas automaticamente. Ração e água foram oferecidas à vontade nas gaiolas-padrão de propileno, sendo a limpeza das gaiolas feita diariamente (exceto aos domingos) para remoção da serragem utilizada como forração. Para a realização dos experimentos, os animais foram transportados do biotério para a sala de privação de sono com o mínimo de perturbação de seu bem-estar, quatro a cinco dias antes do início do experimento. Este projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP nº 1042/05).

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

A) Privação de sono paradoxal

A metodologia de privação de sono paradoxal (PSP) foi realizada da seguinte maneira: os animais foram submetidos à PSP pelo método da plataforma múltipla modificada, de acordo com a descrição de Suchecki e Tufik (2000), por 96 horas, que consiste em colocar 10 animais em um tanque (127 x 44 x 45 cm) contendo 14 plataformas circulares de 6,5cm de diâmetro, sendo o nível da água 1,0 cm abaixo da superfície das plataformas. O número de plataformas maior que o número de animais permite que eles possam mover-se de uma para a outra, ao contrário da imobilização observada no método de

plataforma única. A atonia muscular presente no sono paradoxal faz com que o animal acorde ao encostar o focinho ou, ainda, o corpo inteiro na água.

O grupo controle consistiu de animais mantidos em suas próprias gaiolas de moradia contendo serragem como forração. Durante o rebote de sono os animais retirados do tanque foram também mantidos em gaiolas com serragem.

Um estudo realizado recentemente em nosso laboratório demonstrou que durante o período de privação de sono de 96 horas, o método de plataforma múltipla foi capaz de suprir totalmente o sono paradoxal dos animais (Machado et al, 2004).

Durante todo o período de PSP, a sala foi mantida em condições de temperatura constante ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 7 horas da manhã. A ração e a água foram fornecidas *ad libitum* por meio da grade localizada sobre o tanque. Á água do tanque foi trocada diariamente.

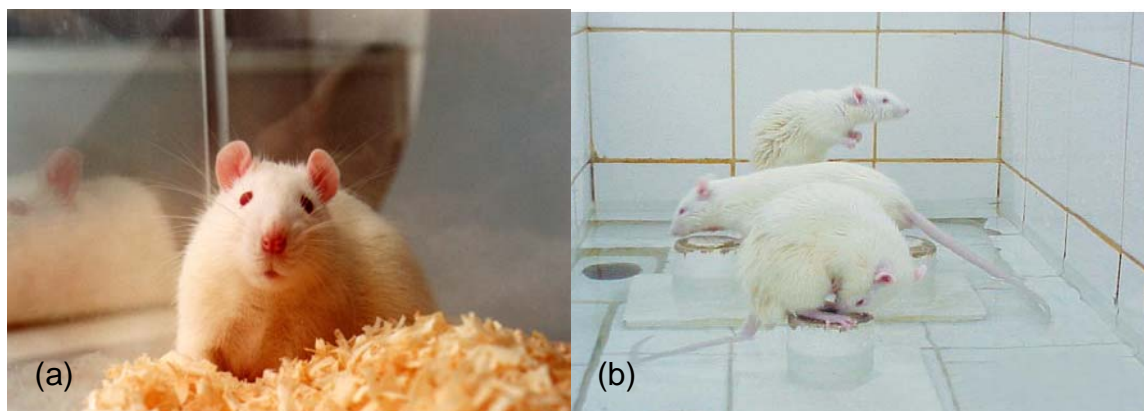


FIGURA 1 – Controle gaiola (a) e privação de sono paradoxal pelo método da plataforma múltipla modificada (b).

B) Teste da placa quente

A placa quente foi utilizada para medir a latência da resposta à dor, de acordo com o método descrito por Eddy e Leim Bach (1953). Os animais foram colocados sobre a placa quente (Ugo Basile, Biological Research Apparatus Company, Comerio, Itália) aquecida a 50°C (Bolles e Fanselow, 1982). O tempo de reação foi definido como a latência para o animal lambar a(s) pata(s) ou saltar da placa, com um tempo máximo de 90 segundos (FIGURA 2).

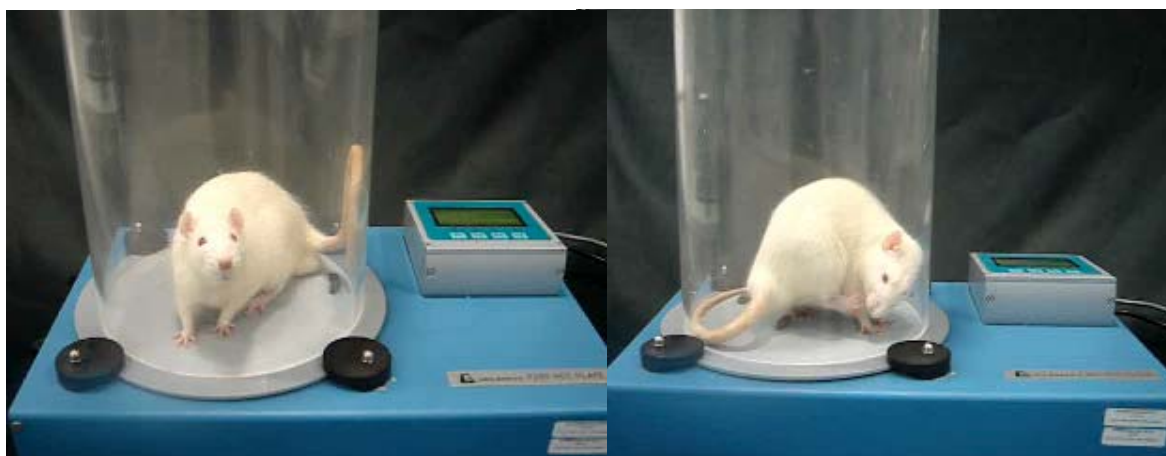


FIGURA 2 – Placa quente

C) Drogas

As seguintes drogas foram administradas: antagonista do receptor NK1 da Substância P (L-732,138, [N-acetyl-L-triptofano-3,5-bis(trifluormetil)-benzil-ester-substância P]), antagonista do receptor NK3 (SB218795, [(-)-(R)-N-(a-methoxycarbonylbenzyl)-2-phenylquinoline-4-carboxamide]) e morfina no experimento comportamental; e [^3H]DAMGO, [^3H][Sar9.Met(O₂)11] substância P e [^3H]senktide na análise autorradiográfica dos receptores. Todas as drogas foram adquiridas na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

D) Protocolo experimental

Experimento 1: Caracterização do efeito da privação de sono paradoxal e do rebote de sono sobre a latência de dor em ratos.

Após uma revisão da literatura foi observado que para a maioria dos estudos a privação de sono paradoxal parece alterar a sensibilidade dolorosa em animais e em seres humanos, entretanto, encontramos alguns estudos com resultados divergentes quanto ao tempo de privação suficiente para causar alteração da sensibilidade dolorosa, assim como o tempo rebote de sono suficiente para retornar a latência de dor para os valores basais. Nesse sentido optamos primeiramente por realizar a caracterização do efeito da privação de sono paradoxal no limiar de retirada da pata, após a aplicação do estímulo térmico. Adicionalmente, Onen e colaboradores (2000) observaram que o efeito da privação de sono foi observado em animais com as patas em condições úmidas, comparado a um basal que estavam com patas secas, inferindo que isto poderia ser responsável por algumas divergências entre os estudos. O estudo descreve, então, que a condição da pata no momento do teste, seca ou úmida pode interferir no resultado. Portanto, realizamos o seguinte experimento:

Grupo Seco: Este grupo consistiu de animais submetidos à placa quente com as patas secas. Para isso, estes animais foram inicialmente distribuídos nos seguintes grupos:

- a) *Controle*
- b) *Privação de sono paradoxal 24 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*
- c) *Privação de sono paradoxal 48 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*
- d) *Privação de sono paradoxal 72 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*
- e) *Privação de sono paradoxal 96 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*

Todos os grupos foram constituídos de 8 animais, e após o fim da PSP ou do período rebote todos os animais, inclusive os do grupo controle, tiveram suas patas secadas com pano seco e foram colocados em uma gaiola com

serragem, por 5 minutos, para secar as patas. Sendo, então, submetidos ao teste da placa quente para a determinação do limiar de reação ao estímulo térmico.

Grupo Úmido: Este grupo consistiu de animais submetidos à placa quente com as patas úmidas. Para isso, estes animais foram inicialmente distribuídos da seguinte forma:

- a) *Controle*
- b) *Privação de sono paradoxal 24 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*
- c) *Privação de sono paradoxal 48 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*
- d) *Privação de sono paradoxal 72 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*
- e) *Privação de sono paradoxal 96 horas*
 - a. *Privado de sono paradoxal*
 - b. *Rebote de sono 24 horas*
 - c. *Rebote de sono 48 horas*

Todos os grupos foram constituídos de 8 animais, e após o fim da PSP ou do período rebote todos os animais, inclusive os do grupo controle, foram colocados em uma gaiola, contendo 1 cm de água a temperatura ambiente, por 5 minutos para umedecer as patas. Sendo, então, submetidos ao teste da placa quente para a determinação do limiar de reação ao estímulo térmico.

Experimento 2: Caracterização do efeito da privação total de sono (PTS) e do rebote de sono sobre a latência de retirada da pata em ratos.

Em humanos, a privação total de sono de 6 horas parece ser suficiente para induzir alterações significativas no ciclo vigília-sono e promover hiperalgesia (Roeres et al, 2006). Após esse período de privação em animais, estes iniciam o sono logo que possível, demonstrando que esse período de privação é importante e pode promover rebote de sono (Ugalde et al, 1994). Com o objetivo de caracterizar também os efeitos da PTS sobre a sensibilidade dolorosa realizamos também o seguinte experimento:

Os animais foram submetidos a PTS pelo método *gentle handling* por 3 e 6 horas iniciando as 07:00h (n = 8 por grupo). O *gentle handling* consistiu em introduzir e remover objetos na gaiola e ocasionalmente tocando cuidadosamente os animais com um pincel quando eles pareciam iniciar o sono. Os ratos não foram perturbados durante a alimentação ou limpeza. Dois grupos de animais privados de sono por 6 horas foram em seguida deixados para o rebote de sono por 1 hora e 2 horas (n = 8 por grupo). Os ratos iniciaram o sono em minutos após a cessação do *gentle handling*. Um grupo controle foi colocado no mesmo ambiente, entretanto não foi manipulado.

Experimento 3: Efeito da morfina e dos antagonistas NK1 e NK3 na latência de retirada da pata de ratos privados de sono paradoxal e durante o período rebote.

Para este experimento os animais foram distribuídos em 4 grupos que receberam as seguintes drogas:

- **SALINA:** Solução salina 0,9% na dose 0,1 mL/100g de peso.
 - *Controle*
 - *Privação de sono paradoxal 96 horas*
 - *Rebote de sono 24 horas*
- **L-732,138:** Antagonista NK1, nas doses de 5 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg, via i.p., 60 minutos antes do teste (Seguin et al, 1995).
 - *Controle*
 - *Privação de sono paradoxal 96 horas*
 - *Rebote de sono 24 horas*
- **SB218795:** Antagonista NK3, na dose de 10 mg/kg, 20 mg/kg e 40 mg/kg, via i.p., 60 minutos antes do teste (Zaratin et al, 2000).
 - *Controle*
 - *Privação de sono paradoxal 96 horas*
 - *Rebote de sono 24 horas*
- **MORFINA:** Agonista opióide, na dose de 2,5 mg/kg, 5 mg/kg e 10 mg/kg, via i.p., via i.p. 60 minutos antes do teste (Espejo et al, 1994).
 - *Controle*
 - *Privação de sono paradoxal 96 horas*
 - *Rebote de sono 24 horas*

Após o fim da PSP ou do período rebote, os animais foram administrados com as drogas e os animais retornaram para o tanque ou para as gaiolas. Somente após 60 minutos da administração, eles foram submetidos ao teste da placa quente para a determinação da latência de retirada da pata.

Experimento 4: Autorradiografia dos receptores μ -opióide, NK1 e NK3 no cérebro de ratos privados de sono paradoxal e no período rebote.

Processamento histológico dos cérebros

Ao fim das 96 horas de PSP e após 24 horas de rebote de sono, os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros, rapidamente removidos, congelados em gelo seco e mantidos a -80°C . Para o processamento histológico, seccionaram-se os cérebros em criostato (-18°C) da região do bulbo olfatório até o bulbo caudal, em secções de 20mm de espessura. Foram utilizadas lâminas revestidas com poli-lisina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Para cada cérebro, cinco secções de tecido consecutivas foram colocadas em cinco lâminas distintas (cinco ligantes), sendo descartadas as cinco secções subseqüentes. Sempre que se completava cada lâmina com seis secções, foi utilizado um novo conjunto de lâminas até o término do cérebro. Apenas uma lâmina contendo seis secções representativas de todo o cérebro foi utilizada para representar a ligação inespecífica de cada cérebro. As lâminas foram colocadas em temperatura ambiente por 10 minutos, aproximadamente. Após essa preparação, as lâminas permaneceram à temperatura de -80°C até o dia da dosagem radioativa.

Incubações

No dia da dosagem radioativa, as lâminas foram retiradas do freezer e mantidas em temperatura ambiente. Todas as condições do procedimento descrito a seguir, incluindo temperatura, tempo de incubação e concentração das substâncias foram determinadas previamente, em estudos que apresentaram a caracterização farmacológica de todos os ligantes utilizados no presente trabalho.

Antes da fase de incubação com o radioligante, as lâminas foram imersas na solução tampão apropriada. Essa etapa do procedimento, denominada de pré-incubação, elimina o ligante endógeno do tecido, evitando, assim, que ocorra uma competição com a substância radioativa.

A fase de incubação resumiu-se à colocação de lâminas na solução tampão apropriada contendo o radioligante, cuja concentração foi previamente determinada. As lâminas com as secções de tecidos para a ligação inespecífica foram incubadas ao mesmo tempo e nas mesmas condições, adicionando-se a elas uma grande concentração de uma droga deslocadora ou droga fria. Essa droga fria é um ligante específico para o receptor em questão, que competiu na ocupação do receptor com o radioligante com o objetivo de determinar a ligação inespecífica, ou seja, se a droga também se liga em outros receptores.

A fase subsequente, denominada de lavagem, consistiu em remover o excesso do ligante radioativo em solução tampão. Em seguida, as lâminas passaram por uma rápida imersão em água destilada a 4°C, destinada a remover o excesso de sais da solução tampão, e foram secas em temperatura ambiente.

Exposição e revelação de filmes

Depois de secas, as lâminas, contendo secções cerebrais de um animal do grupo controle e um outro do grupo experimental, foram organizadas em sequência e colocadas em um mesmo cassete, em conjunto com o padrão calibrado (Amersham Canada, Oakville, ON, Canadá).

Em uma sala escura, os filmes sensíveis ao trítio (Kodak®), foram colocados sobre as lâminas e mantidos à temperatura de 4°C até o dia da revelação. Após o período de exposição, os filmes foram revelados com o revelador Kodak 0-19 e o fixador Kodak Rapid Fixer, de acordo com as instruções do fabricante.

Análise densitométrica

Após a revelação, os filmes foram codificados para evitar o reconhecimento dos grupos a serem analisados. A quantificação dos receptores foi feita por análise computadorizada de imagem (MCIO System, Imaging Research Inc., St. Catharines, ON, Canadá). Todas as áreas cerebrais que apresentaram um sinal claro de marcação foram quantificadas, sem pré-seleção de regiões de interesse. Inicialmente, o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade óptica para cada região cerebral delimitada dentro de cada secção. Em seguida, a média dos valores dessa mesma região foi quantificada para todas as secções dentro de cada cérebro. O valor final em J.I.Ci/g de tecido apresentado nas tabelas é a média da região cerebral de todos animais dentro de cada grupo. As regiões anatômicas serão definidas de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (1986).

Marcação radioativa em receptores μ -opioides

O procedimento autorradiográfico para a marcação dos receptores μ -opioides foi semelhante àquele descrito por Fadda e colaboradores (1991) com algumas modificações.

As secções foram pré-incubadas em temperatura ambiente, por 40 minutos, em solução tampão Tris-HCl (100 mM; pH 7,4) e incubadas com a adição de 3 nM de [3 H]DAMGO (50 Ci/mmol) por 40 minutos à temperatura ambiente. A marcação em sítios inespecíficos foi determinada com o acréscimo de 1 mM de naloxona em secções adjacentes. Depois da incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes por 3 minutos em “ice cold buffer”, em seguida foram rapidamente lavadas por 10 segundos em água deionizada a 4°C. Depois de secas, as lâminas foram submetidas à exposição em filmes sensíveis ao trítio (Kodak®), durante 8 semanas, na presença de padrões calibrados.

Marcação radioativa em receptores NK1

A medida radioativa para a análise autorradiográfica de receptores NK1 seguiu a descrição de Dam e colaboradores (1990) e Stoessl e Hill (1990). As lâminas com as secções cerebrais foram pré-incubadas por um período de 15 minutos em solução tampão Tris-HCL (50 mM; pH 7,4), sendo, em seguida, incubadas durante 90 minutos na mesma solução tampão contendo 3nM de [3 H][Sar9.Met(O₂)11] substância P (2200 Ci/mmol, Dupont NEN Research Products, Mississauga, ON, Canadá).

A marcação de sítios inespecíficos foi obtida em secções adjacentes, pela adição de 1 μ M de substância P. Após o período de incubação, as lâminas

foram lavadas quatro vezes, por 60 segundos, em Tris-HCl (50 mM; pH 7,4; 4°C) e, subsequente, em um rápido banho de 10 segundos em água deionizada a 4°C. Em seguida, as secções foram secas em temperatura ambiente e expostas a filme sensível ao trítio (Kodak®) por 10 semanas, na presença de padrões calibrados.

Marcação radioativa em receptores NK3

O procedimento autoradiográfico para a marcação dos receptores NK3 foi semelhante àquele descrito por Langlois e colaboradores (2001). As secções foram pré-incubadas, por 20 minutos, em solução tampão Hepes Buffer (20 mM; pH 7,4) e incubadas com a adição de 2,5 nM de [³H]senktide (85,0 Ci/mmol, Dupont NEN Research Products, Mississauga, ON, Canadá) por 45 minutos à temperatura de 0°C. A marcação em sítios inespecíficos foi determinada com o acréscimo 1 µM de senktide em secções adjacentes. Depois da incubação, as lâminas foram lavadas em quatro banhos consecutivos de 60 segundos, em solução Hepes buffer, 0,05% BA e 0,01 dodecil sulfato de sódio, em seguida foram rapidamente lavadas por 10 segundos em água deionizada a 4°C. Depois de secas, as lâminas foram submetidas à exposição em filmes sensíveis ao trítio (Kodak®), durante 12 semanas, na presença de padrões calibrados.

E) Análise estatística

Os dados comportamentais foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) após realização do teste de normalidade e homogeneidade das amostras. Para o experimento 1 foi utilizado ANOVA de duas vias tendo como fatores o tempo (Controle x Privação de sono x Rebote) e o grupo (seco x úmido). O experimento 2 foi analisado utilizando ANOVA de uma via tendo como fator o tempo (Controle x Privação de sono x Rebote). O experimento 3 foi analisado por meio da ANOVA de duas vias, tendo como fatores o tempo (Controle x Privação de sono x Rebote) e drogas (salina x 3 doses de cada droga – morfina, antagonista NK1, antagonista NK3); todas as análises foram seguidas do teste Duncan. Para o estudo autorradiográfico foi utilizado o teste de ANOVA uma via, seguido do teste Duncan se necessário para cada área estudada, tendo como fator o tempo (Controle x Privação de sono x Rebote). As análises foram realizadas com o programa Statistic 6.0. e o nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Experimento 1: Caracterização do efeito da privação de sono paradoxal e do rebote de sono sobre o limiar de retirada da pata em ratos

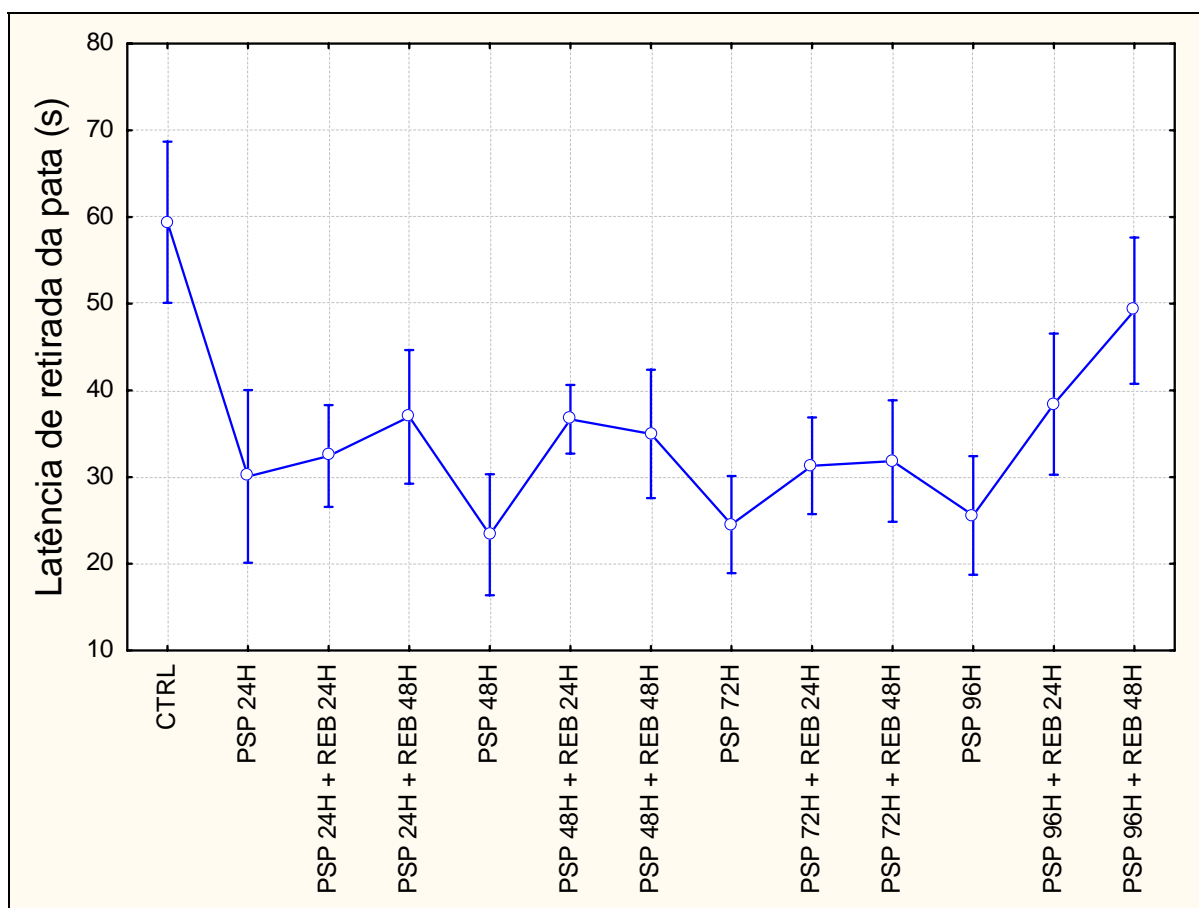


FIGURA 3 – Efeito longitudinal da privação de sono paradoxal sobre o limiar de retirada da pata após o estímulo térmico. ANOVA, $p < 0,05$. As barras verticais representam o intervalo de confiança 0,95.

A análise de variância (ANOVA) de duas vias revelou diferenças significativas para os fatores TEMPO DE PRIVAÇÃO [$F_{(12,144)}=9,0921$, $p < 0,05$], GRUPOS [$F_{(1,12)}=30,950$, $p < 0,05$], no entanto, não mostrou diferença na INTERAÇÃO [$F_{(12,144)}=0,95137$, $p > 0,05$]. A FIGURA 3 mostra o efeito longitudinal da privação de sono paradoxal na latência de retirada da pata de

animais, desde 24h até 96 h, e os seus respectivos rebotes de sono, de 24 h e 48 h, ou seja, efeito o TEMPO DE PRIVAÇÃO.

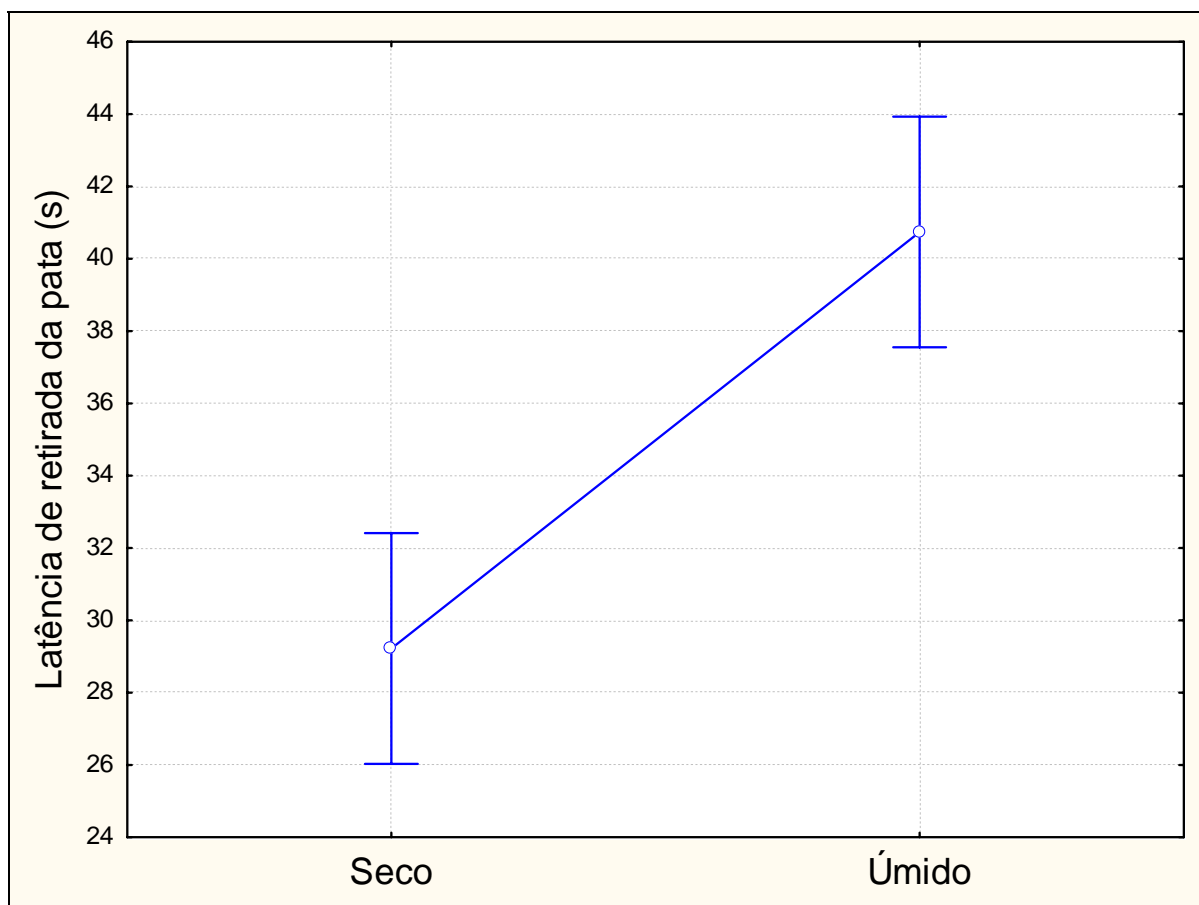


FIGURA 4 – Efeito da condição da pata dos animais, no momento do teste da placa quente, no limiar de resposta nociceptiva. ANOVA, $p < 0,05$. As barras verticais representam o intervalo de confiança 0,95.

Quando analisamos a FIGURA 4, que representa o efeito GRUPO [$F_{(1,12)}=30,950$, $p < 0,05$], observamos que o grupo úmido, que representou os animais com as patas molhadas no momento do teste, demonstrou uma latência para a retirada da pata significativamente maior quando comparado com o grupo seco. Representando a importância da condição da pata, seca ou úmida, no momento do teste da placa quente.

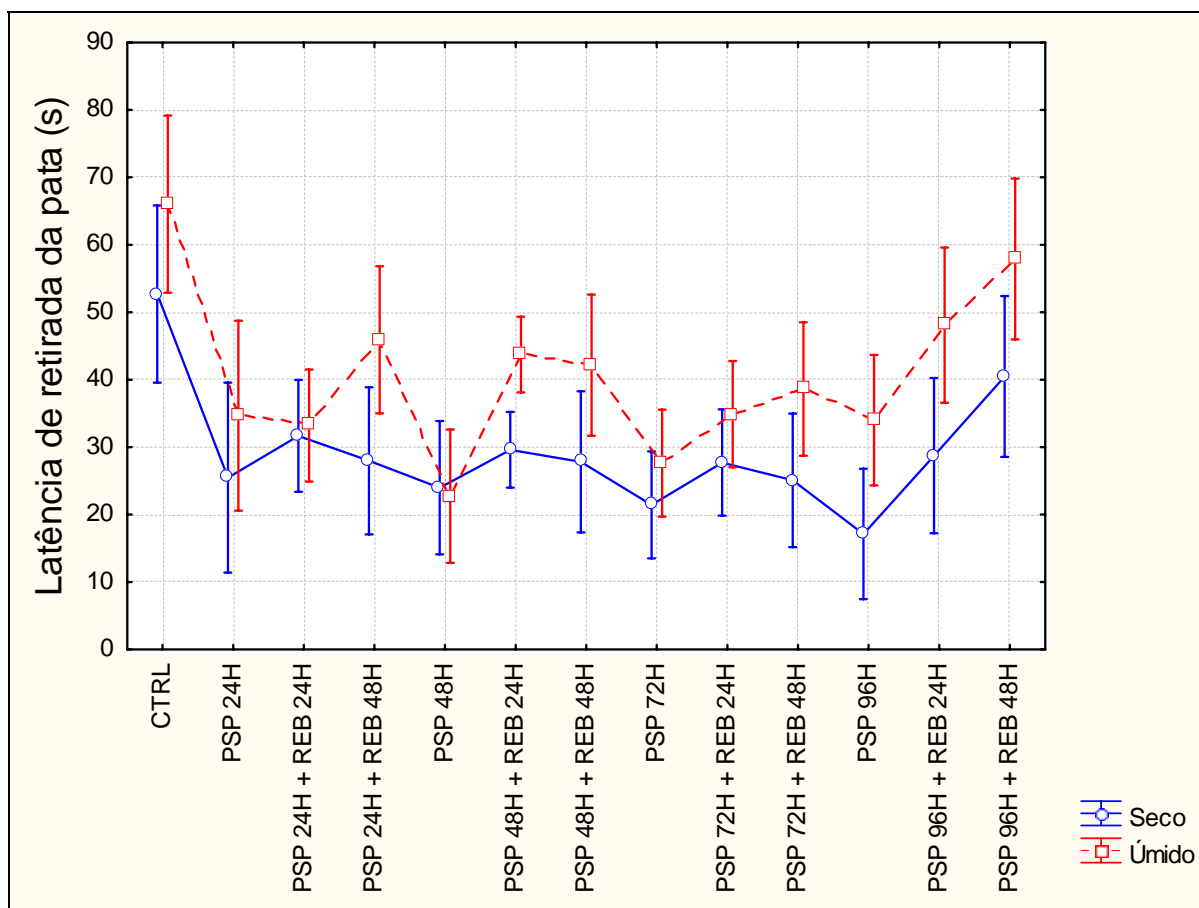


FIGURA 5 – Interação tempo de privação de sono paradoxal x grupo (seco e úmido). ANOVA, $p > 0,05$. As barras verticais representam o intervalo de confiança 0,95.

Apesar da diferença significativa no efeito GRUPO [$F_{(1,12)}=30,950$, $p < 0,05$], de acordo com a FIGURA 5, os grupos seco e úmido apresentaram a mesma distribuição longitudinal (efeito INTERAÇÃO [$F_{(12,144)}=,95137$, $p > 0,05$]), ou seja, mostrando que independente da condição da pata, o efeito longitudinal da privação de sono paradoxal se mostrou regular, sendo a latência do grupo úmido maior que a latência do grupo seco.

As FIGURAS 6 a 9 representam os dados longitudinais em barras, dos grupos seco e úmido, e o teste de comparação (Duncan) após o teste ANOVA. Observamos que, nesses gráficos, a privação de sono paradoxal promoveu redução do limiar de retirada da pata desde o primeiro dia, e que, 48 horas de rebote foi suficiente para retornar a latência para os valores basais apenas após 96 horas de privação nos dois grupos, seco e úmido, o que não foi observado após 24 horas, 48 horas ou 72 horas de privação.

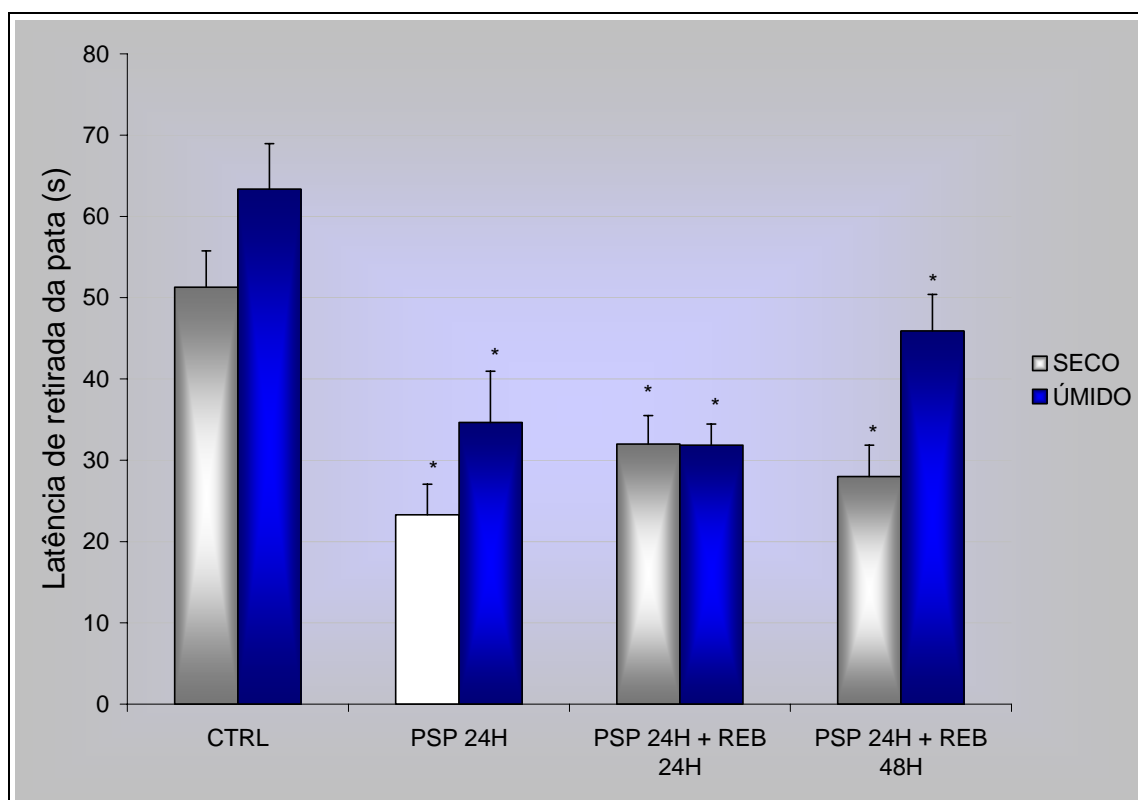


FIGURA 6 – Latência de retirada da pata de animais privados de sono paradoxal (24 horas) e rebote (24 e 48 horas) nas condições seco e úmido. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

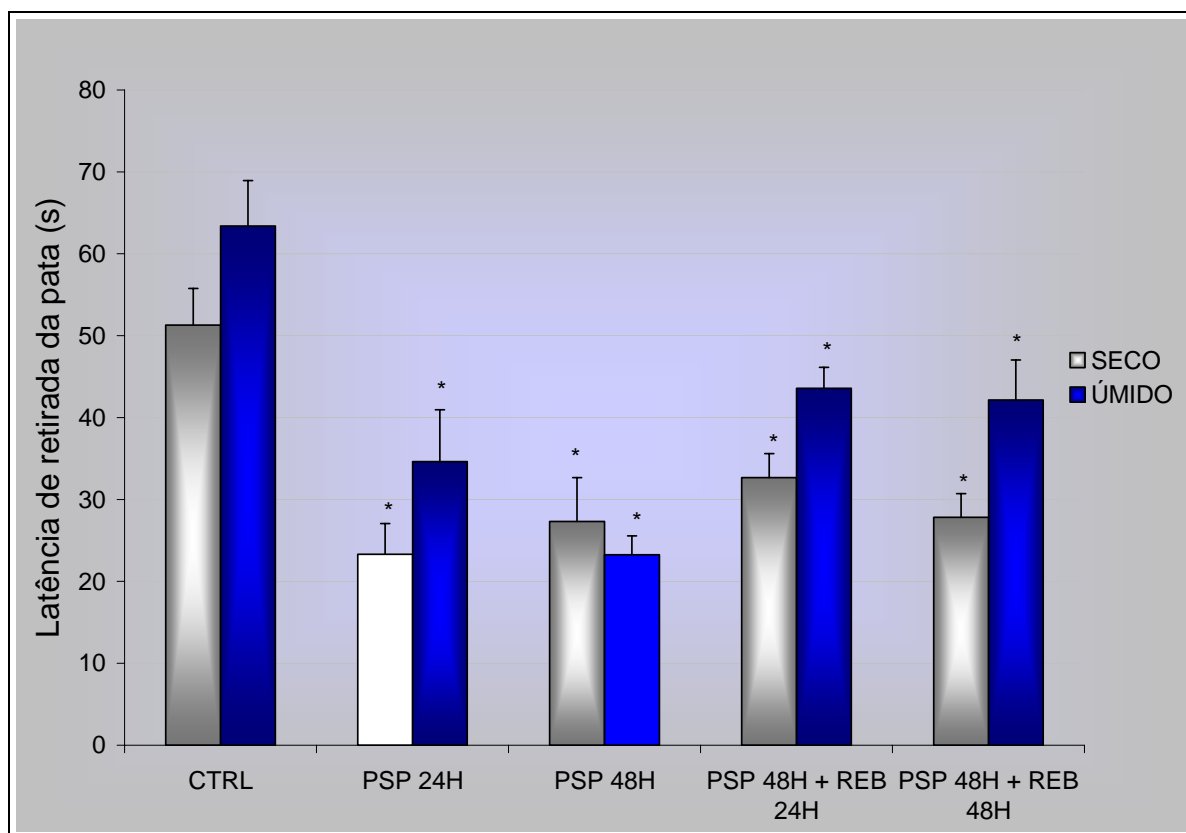


FIGURA 7 – Latência de retirada da pata de animais privados de sono paradoxal (48 horas) e rebote (24 e 48 horas) nas condições seco e úmido. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

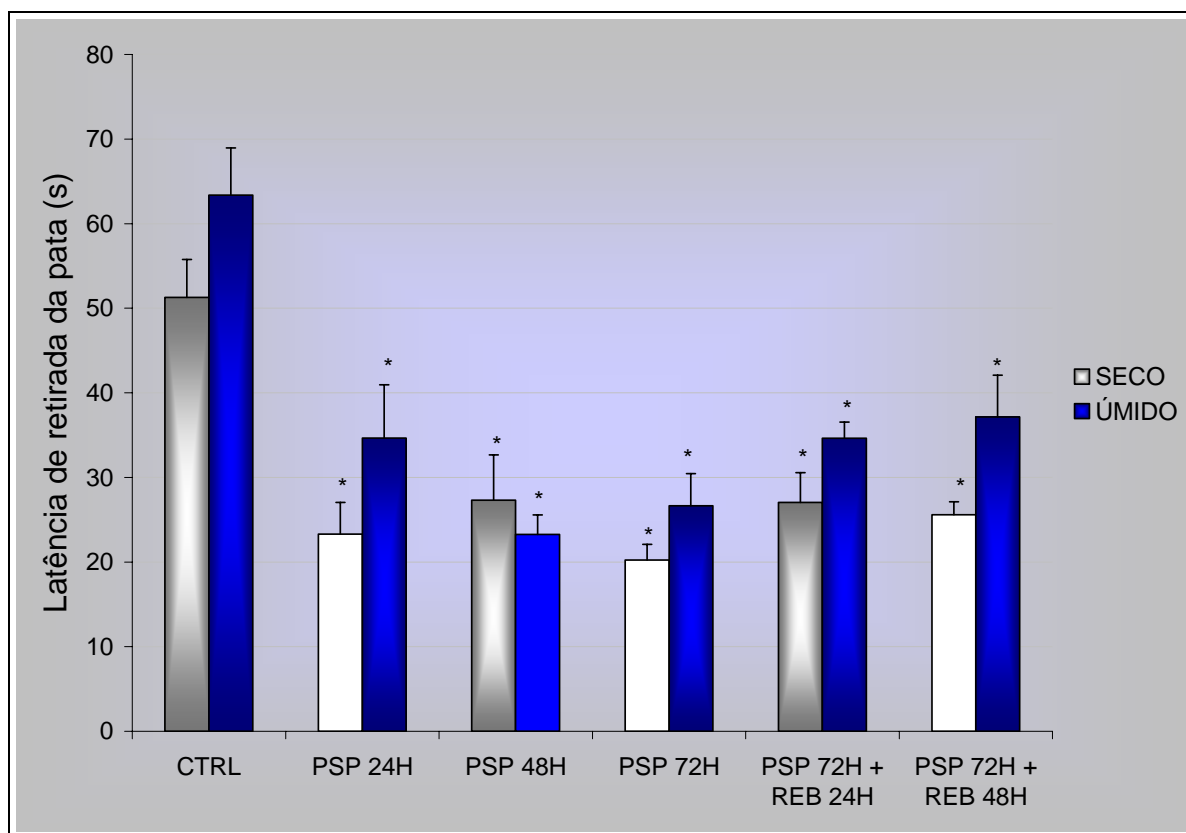


FIGURA 8 – Latência de retirada da pata de animais privados de sono paradoxal (72 horas) e rebote (24 e 48 horas) nas condições seco e úmido. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

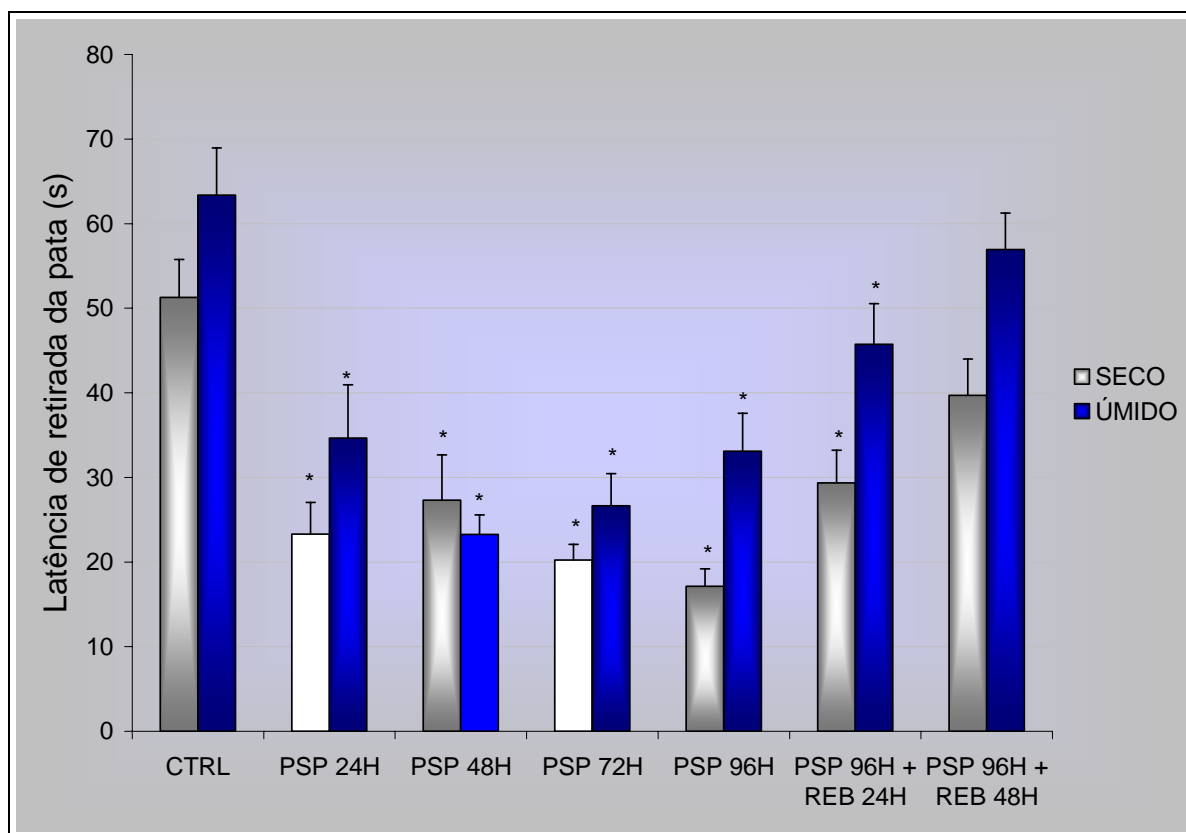


FIGURA 9 – Latência de retirada da pata de animais privados de sono paradoxal (96 horas) e rebote (24 e 48 horas) nas condições seco e úmido. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo controle (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

Experimento 2: Caracterização do efeito da privação total de sono (PTS) e do rebote de sono sobre o limiar de retirada da pata em ratos

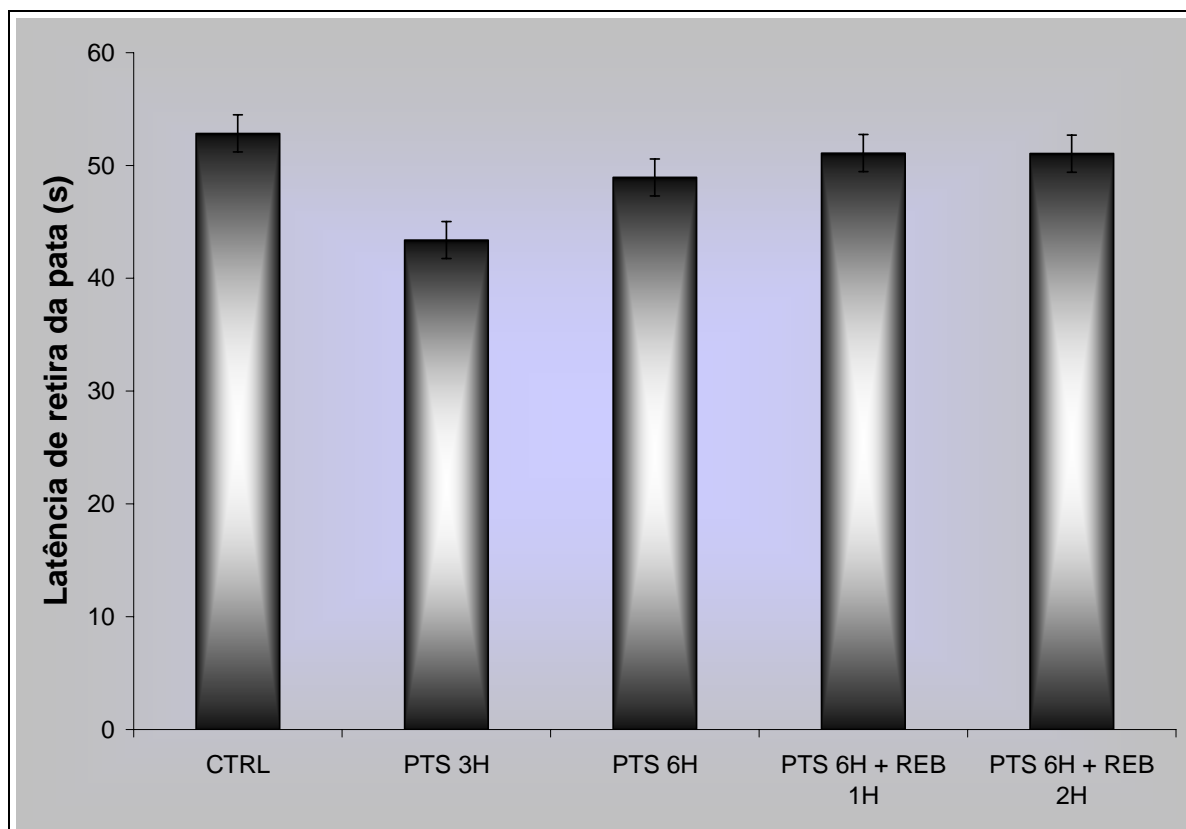


FIGURA 10 – Efeito da privação total de sono pelo método de *gentle handling* e rebote sobre a sensibilidade dolorosa. Os resultados estão expressos em média ± EP (ANOVA – Duncan teste, $p > 0,05$).

A FIGURA 10 representa os valores de latência dos animais submetidos a privação total de sono. A ANOVA de uma via demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos privado e rebote em relação ao grupo controle [$F_{(4,35)}=1,2027$, $p > 0,05$].

Experimento 3: Efeito da morfina e dos antagonistas NK1 e NK3 no limiar de retirada da pata em ratos privados de sono paradoxal (PSP) e no período rebote (REB)

Baseado nos dados descritos previamente, o efeito longitudinal da privação de sono paradoxal, optamos por utilizar, durante a manipulação farmacológica, a condição seca da pata, assim como, o período de 96 horas de PSP e 24 horas de rebote de sono após 96 horas de PSP.

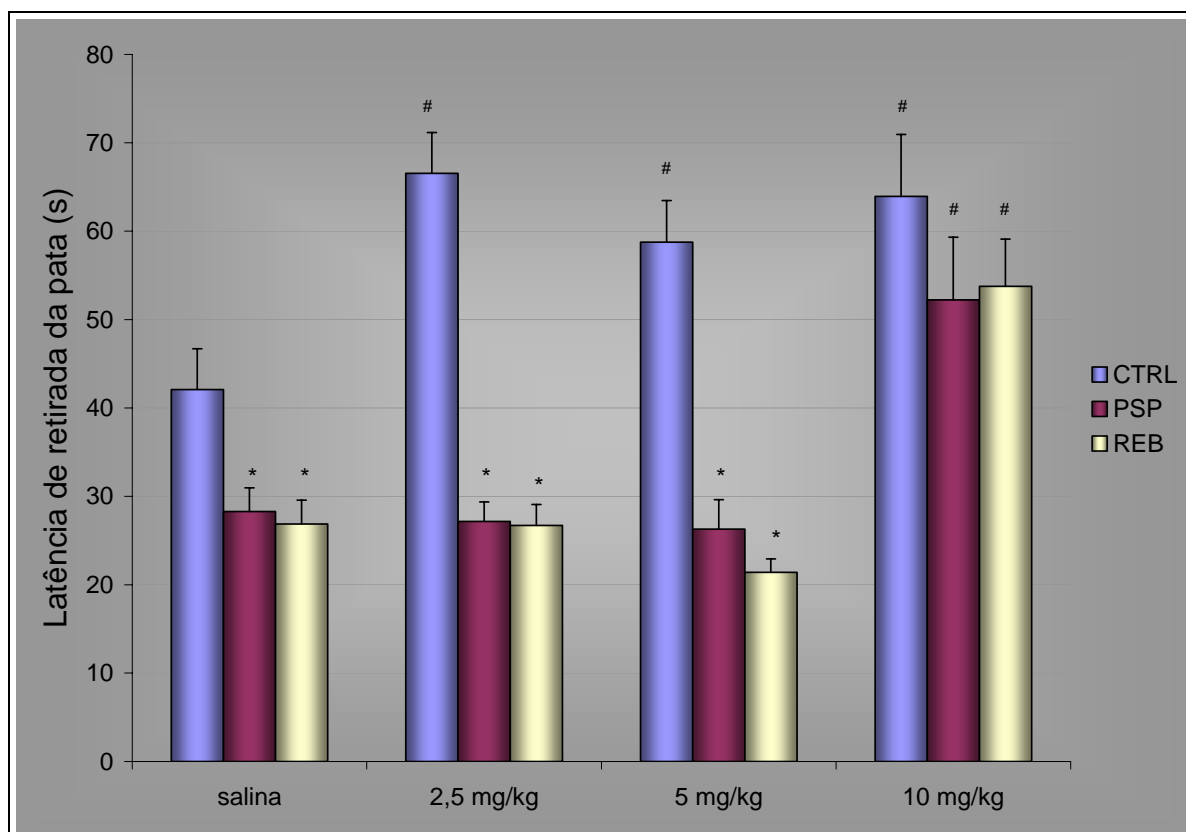


FIGURA 11 – Latência de retirada da pata de animais controle, privados de sono paradoxal (96h) e rebote (24h) após a administração de salina ou morfina em 3 doses. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo CTRL (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

Comparado ao respectivo grupo salina (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

A ANOVA duas vias revelou diferenças significativas no fator TEMPO DE PRIVAÇÃO [$F_{(2,21)}=33,205$, $p<0,05$], DROGA [$F_{(3,63)}=15,006$, $p<0,05$] e INTERAÇÃO [$F_{(6,63)}=3,0189$, $p<0,05$] para o tratamento com salina ou morfina, indicando que as doses de morfina apresentam comportamentos diferentes nos tempos estudados. A FIGURA 11 representa esses valores de latência dos animais administrados com três doses de morfina ou salina no grupo controle, após 96 horas de PSP ou após 24 horas de rebote. Observamos após a realização do teste Duncan, que a morfina apresentou efeito analgésico nas três doses utilizadas, ao aumentar a latência de retirada da pata no teste da placa quente, quando comparada ao grupo CTRL-salina. No entanto, 96 horas PSP antagonizou o efeito analgésico da morfina nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, efeito que persistiu mesmo após 24 horas de rebote de sono. Porém, em doses mais altas (10 mg/kg) a morfina foi capaz de exercer seu efeito analgésico, também, nos animais privados de sono paradoxal e rebote.

Uma análise percentual desta redução mostra que a privação de sono paradoxal reduziu a latência em 40,75% (salina), 56,60% (2,5 mg/kg), 56,74% (5 mg/kg) e 9,88% (10 mg/kg); enquanto que o grupo rebote apresentou redução de 43,91% (salina), 57,59% (2,5 mg/kg), 63,42% (5 mg/kg) e 14,05% (10 mg/kg).

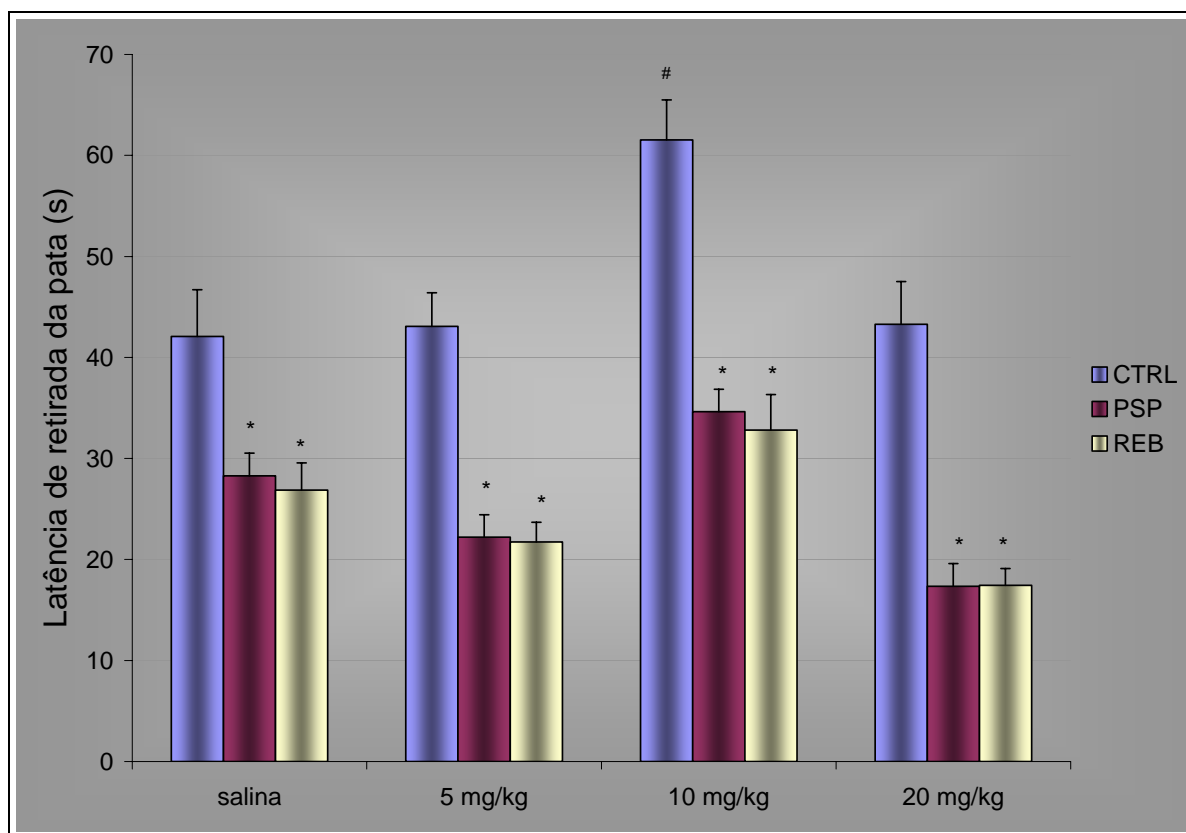


FIGURA 12 – Limiar de retirada da pata de animais controle, privados de sono paradoxal (96h) e rebote (24h) após a administração de salina ou L-732,138 (antagonista NK1) em 3 doses. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo CTRL (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

Comparado ao respectivo grupo salina (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

A ANOVA duas vias demonstrou efeito TEMPO DE PRIVAÇÃO [$F_{(2,20)}=88,189$, $p < 0,05$], DROGA [$F_{(3,60)}=7,4396$, $p < 0,05$], mas não mostrou efeito INTERAÇÃO [$F_{(6,60)}=,53189$, $p > 0,05$]. Como podemos observar na FIGURA 12, os animais do grupo controle administrados com antagonista NK1 apresentaram aumento da latência de retirada da pata, no entanto, o teste de Duncan revelou diferença significativa apenas para a dose de 10 mg/kg. A privação de sono paradoxal promoveu redução de 32,75% (salina), 48,46% (2,5 mg/kg), 43,72% (5 mg/kg) e 59,90% (10 mg/kg) da latência de retirada da pata respectivamente nos grupo salina, 5, 10 e 20 mg/kg; bloqueando, assim,

significativamente o efeito analgésico da dose de 10 mg/kg de antagonista NK1.

Esse efeito permaneceu até o período rebote de 24 horas.

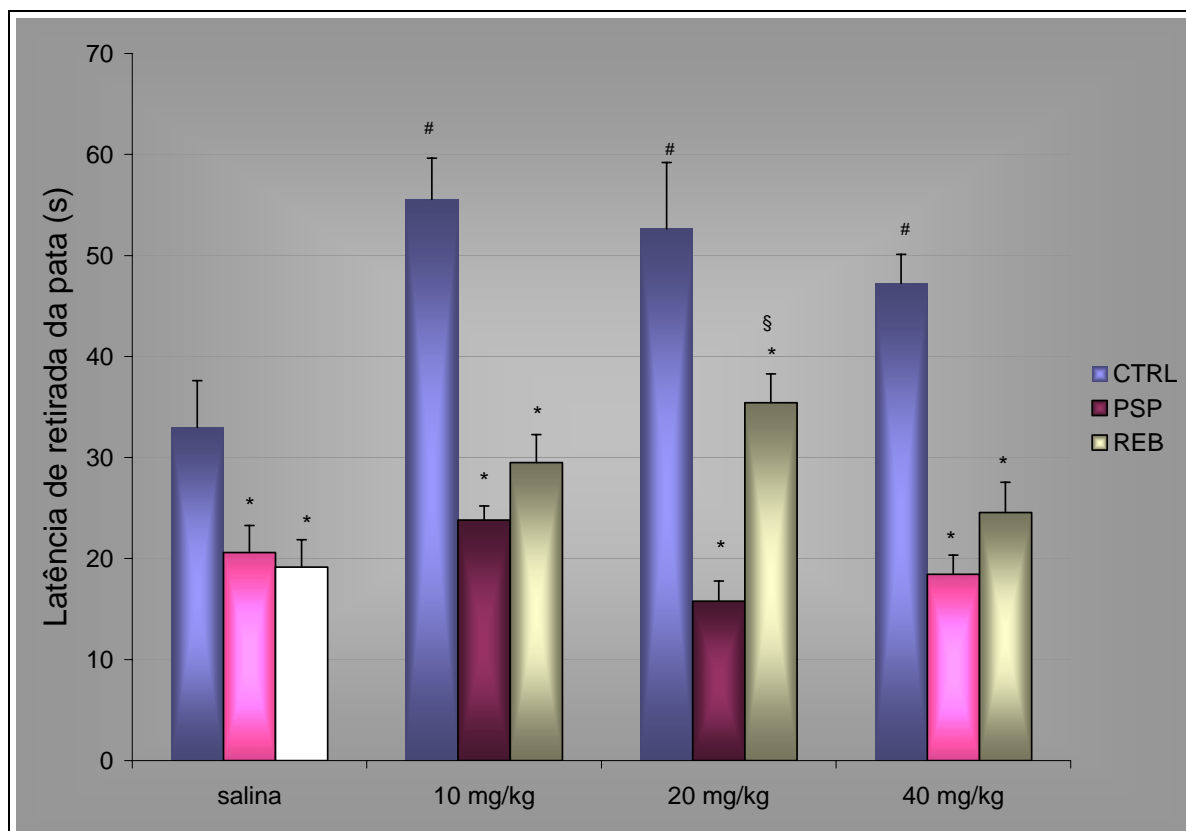


FIGURA 13 - Latência de retirada da pata de animais controle, privados de sono paradoxal (96h) e rebote (24h) após a administração de salina ou SB218795 (antagonista NK3) em 3 doses. Os resultados estão expressos em média \pm EP.

* Comparado ao respectivo grupo CTRL (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

Comparado ao respectivo grupo salina (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

§ Comparado ao respectivo grupo PSP (ANOVA – Duncan teste, $p < 0,05$).

Quanto ao tratamento com antagonista dos receptores NK3 (FIGURA 13), a ANOVA duas vias revelou efeito TEMPO DE PRIVAÇÃO [$F_{(2,18)}=62,264$, $p < 0,05$], DROGA [$F_{(3,54)}=6,0635$, $p < 0,05$] e efeito INTERAÇÃO [$F_{(6,54)}=2,3492$, $p < 0,05$]. Sendo assim, ao observamos o grupo salina, verificamos novamente que a privação de sono paradoxal reduziu o limiar de retirada da pata,

permanecendo até depois de 24 horas de rebote. O antagonista NK3 apresentou efeito analgésico ao aumentar a latência de retirada da pata nos animais, e o teste Duncan evidenciou que este efeito foi significativo nas três doses utilizadas, em comparação ao grupo CTRL-salina. Porém, a privação de sono paradoxal bloqueou significativamente o efeito analgésico das três doses do antagonista NK3, ao reduzir a latência de retirada de pata. O efeito INTERAÇÃO observado demonstra que as doses do antagonista NK3 apresentam comportamento diferente ao longo dos tempos estudados, ou seja, esta diferença situa-se no período rebote. Mesmo após o rebote de sono de 24 horas a latência permanece reduzida nos grupos tratados com doses de 10 e 40 mg/kg, entretanto na dose de 20 mg/kg o rebote de 24 horas foi suficiente para retornar a latência para os valores dos animais tratados apenas com salina.

Experimento 4: Autorradiografia dos receptores μ -opiíde, NK1 e NK3 no cérebro de ratos privados de sono paradoxal e no período rebote

A ligação de receptores μ -opiídes através da ligação com [3 H]DAMGO não foi estatisticamente diferente ($p > 0,05$) entre os grupos CTRL, PSP 96H e PSP 96H + REB 24H nas 33 regiões analisadas. A FIGURA 14 representa a marcação de [3 H]DAMGO em receptores μ -opiídes no cérebro de ratos e a TABELA 1 representa os valores de ligação nos diferentes grupos. As regiões mais escuras são as regiões com maior ligação do radioligante.

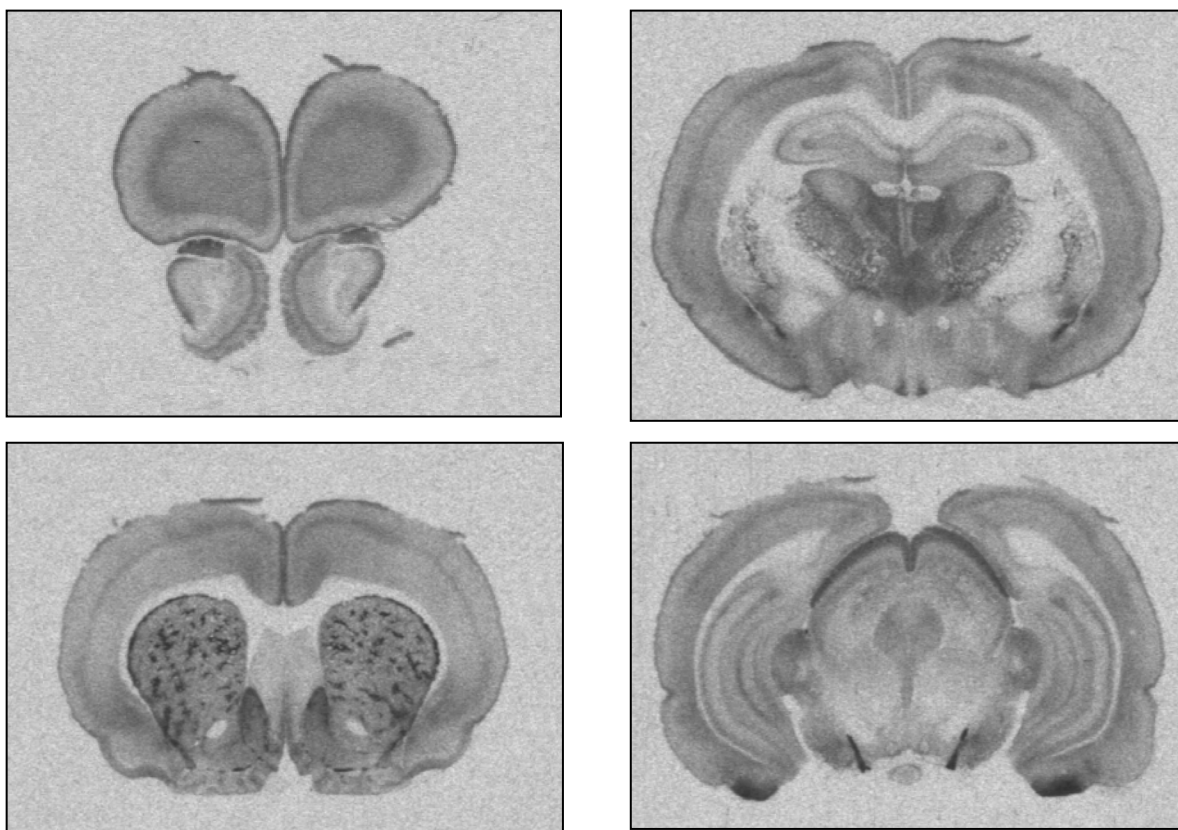


FIGURA 14 – Ilustração da marcação de [3 H]DAMGO em receptores μ -opiídes no cérebro de ratos, cortes coronais desde o bulbo olfatório ao tronco encefálico. Observa-se a densidade da marcação, quanto mais escura a região, maior a densidade da ligação do radioligante.

TABELA 1 – Ligação de [³H]DAMGO nos receptores μ-opiídeos após 96 horas de privação de sono paradoxal e 24 horas de rebote

Estrutura cerebral	CTRL (n=10)			PSP 96H (n=10)			PSP 96H + REB 24H (n=10)		
Córtex									
Associação frontal II	0,98	±	0,11	1,06	±	0,14	1,08	±	0,11
Associação frontal III	2,12	±	0,18	2,17	±	0,22	2,20	±	0,18
Cíngulo, área 1, I	1,28	±	0,16	1,26	±	0,13	1,32	±	0,12
Cíngulo, área 2, I	1,34	±	0,18	1,35	±	0,13	1,40	±	0,12
Somatosensório primário, I	0,63	±	0,09	0,69	±	0,08	0,68	±	0,07
Somatosensório primário, II	0,63	±	0,10	0,67	±	0,09	0,65	±	0,07
Amígdala zona de transição	5,39	±	0,47	5,90	±	0,58	6,11	±	0,57
Núcleo Accumbens									
Core	2,02	±	0,21	2,33	±	0,32	2,43	±	0,22
Shell	2,86	±	0,26	2,81	±	0,31	2,97	±	0,23
Tubérculo Olfatório	1,09	±	0,13	1,14	±	0,12	1,10	±	0,11
Hipocampo									
CA1	0,65	±	0,10	0,73	±	0,10	0,68	±	0,09
CA3	1,44	±	0,14	1,35	±	0,16	1,48	±	0,16
Caudado putâmen									
Anterior	2,26	±	0,23	2,41	±	0,35	2,44	±	0,26
Dorsomedial	1,34	±	0,15	1,50	±	0,19	1,58	±	0,16
Ventrolateral	1,64	±	0,19	1,82	±	0,24	1,95	±	0,28
Dorsolateral	1,17	±	0,16	1,41	±	0,18	1,41	±	0,18
Posterior	0,74	±	0,10	0,73	±	0,11	0,80	±	0,10
Área septal									
Núcleo medial septal	1,90	±	0,20	1,67	±	0,17	1,83	±	0,17
Núcleos Talâmicos									
Mediodorsal, parte central	2,05	±	0,18	1,87	±	0,19	1,98	±	0,19
Mediodorsal, parte lateral	3,39	±	0,27	3,21	±	0,33	3,21	±	0,24
Mediodorsal, parte medial	3,28	±	0,23	3,28	±	0,36	3,32	±	0,30
Hipotálamo									
Área hipotalâmica lateral	0,72	±	0,11	0,66	±	0,08	0,70	±	0,08
Área preóptica medial	0,73	±	0,09	0,69	±	0,09	0,80	±	0,04
Área preóptica lateral	0,93	±	0,12	0,78	±	0,10	0,76	±	0,08
Núcleo ventromedial	0,84	±	0,07	0,99	±	0,11	0,96	±	0,10
Substância cinzenta Periaquedutal									
Dorsomedial	0,62	±	0,09	0,71	±	0,08	0,73	±	0,07
Dorsolateral	1,40	±	0,16	1,49	±	0,14	1,56	±	0,12
Lateral	0,64	±	0,10	0,73	±	0,08	0,78	±	0,07
Substância negra									
Parte medial	4,32	±	0,35	3,96	±	0,33	4,47	±	0,39
Parte compacta	1,16	±	0,16	1,24	±	0,14	1,28	±	0,12
Parte reticular caudal	2,60	±	0,30	2,63	±	0,32	2,47	±	0,25
Área tegmentar ventral	0,75	±	0,10	0,85	±	0,09	0,80	±	0,07
Locus coeruleus	2,77	±	0,25	3,05	±	0,29	2,88	±	0,15

Os valores são expressos em média ± EP in μCi/gT.
ANOVA uma via (p>0,05).

A ligação de receptores NK1 através da ligação com [³H][Sar9.Met(O₂)11] substância P também não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos CTRL, PSP 96H e PSP 96H + REB 24H nas 22 áreas analisadas. A FIGURA 15 e a TABELA 2 representam a marcação de [³H][Sar9.Met(O₂)11] substância P em receptores NK1 no cérebro de ratos.

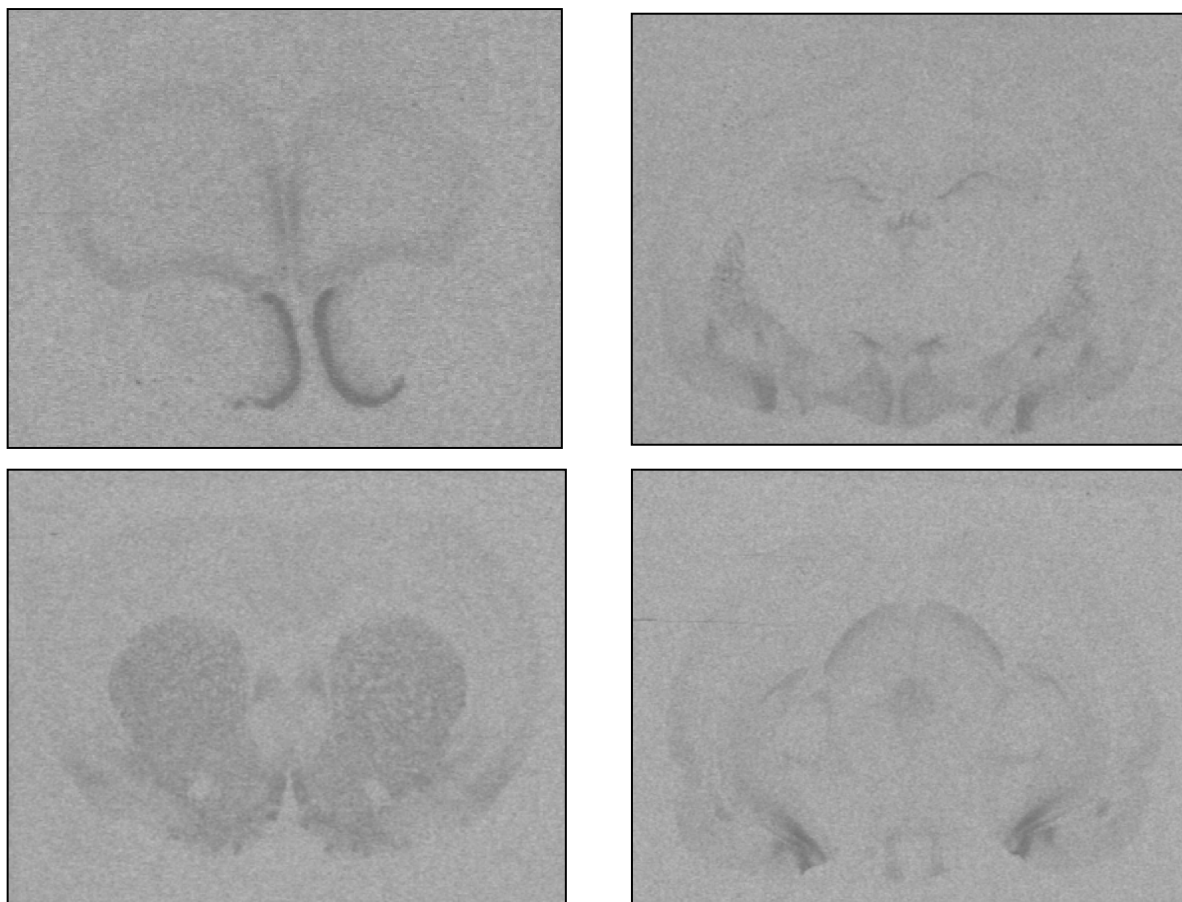


FIGURA 15 - Ilustração da marcação de [³H][Sar9.Met(O₂)11] substância P em receptores NK1 no cérebro de ratos, cortes coronais desde o bulbo olfatório ao tronco encefálico. Observa-se a baixa densidade da marcação, quanto mais escura a região, maior a densidade da ligação do radioligante.

TABELA 2 – Ligação de [³H][Sar9.Met(O₂)11] substância P nos receptores NK1 após 96 horas de privação de sono paradoxal e 24 horas de rebote.

Estrutura cerebral	CTRL (n=8)			PSP 96H (n=9)			PSP 96H+ REB 24H (n=8)		
Bulbo olfatório									
Lâmina plexiforme externa	0,58	±	0,03	0,62	±	0,04	0,65	±	0,03
Lâmina granular celular	0,22	±	0,03	0,23	±	0,02	0,25	±	0,02
Córtex de associação frontal									
Lâmina externa	0,12	±	0,03	0,13	±	0,02	0,14	±	0,03
Lâmina interna	0,08	±	0,01	0,07	±	0,01	0,09	±	0,02
Córtex orbital ventral	0,49	±	0,03	0,52	±	0,08	0,49	±	0,04
Caudado putâmen	0,27	±	0,02	0,29	±	0,02	0,27	±	0,02
Núcleo accumbens	0,24	±	0,01	0,27	±	0,02	0,23	±	0,03
Área preóptica									
Área preóptica lateral	0,15	±	0,01	0,18	±	0,02	0,17	±	0,04
Núcleos préópticos medial	0,23	±	0,02	0,28	±	0,02	0,26	±	0,03
Área hipotalâmica									
Núcleo hipotalâmico									
lateroanterior	0,44	±	0,02	0,46	±	0,04	0,44	±	0,04
Anterior, parte anterior	0,22	±	0,03	0,25	±	0,03	0,21	±	0,01
Lateral	0,12	±	0,01	0,14	±	0,02	0,12	±	0,02
Núcleo amigdalóide									
Cortical anterior	1,22	±	0,05	1,33	±	0,04	1,40	±	0,05
Cortical posteromedial	1,21	±	0,04	1,26	±	0,04	1,24	±	0,04
Giro denteado ventral	0,82	±	0,04	0,83	±	0,03	0,84	±	0,06
Colículo superior									
Lâmina zonal	0,44	±	0,02	0,49	±	0,02	0,47	±	0,03
Lâmina cinzenta superficial	0,30	±	0,02	0,34	±	0,02	0,31	±	0,03
Substância cinzenta									
periaquedutal									
Dorsomedial	0,33	±	0,02	0,33	±	0,01	0,30	±	0,02
Dorsolateral	0,29	±	0,02	0,29	±	0,02	0,27	±	0,02
Lateral	0,23	±	0,02	0,22	±	0,01	0,22	±	0,02
Núcleo medial parabraqial	0,36	±	0,02	0,38	±	0,01	0,36	±	0,04
Lócus coeruleus	0,97	±	0,04	0,88	±	0,02	0,92	±	0,05

Os valores são expressos em média ± EP uCi/g tecido
ANOVA, uma via (p>0,05).

Não foi observada diferença significativa na ligação de [^3H]senktide em receptores NK3 após a 96 horas de privação de sono paradoxal e 24 horas de rebote ($p>0,05$). A FIGURA 16 e a TABELA 3 representam a distribuição desses receptores e valores de ligação nas 12 áreas cerebrais analisadas.

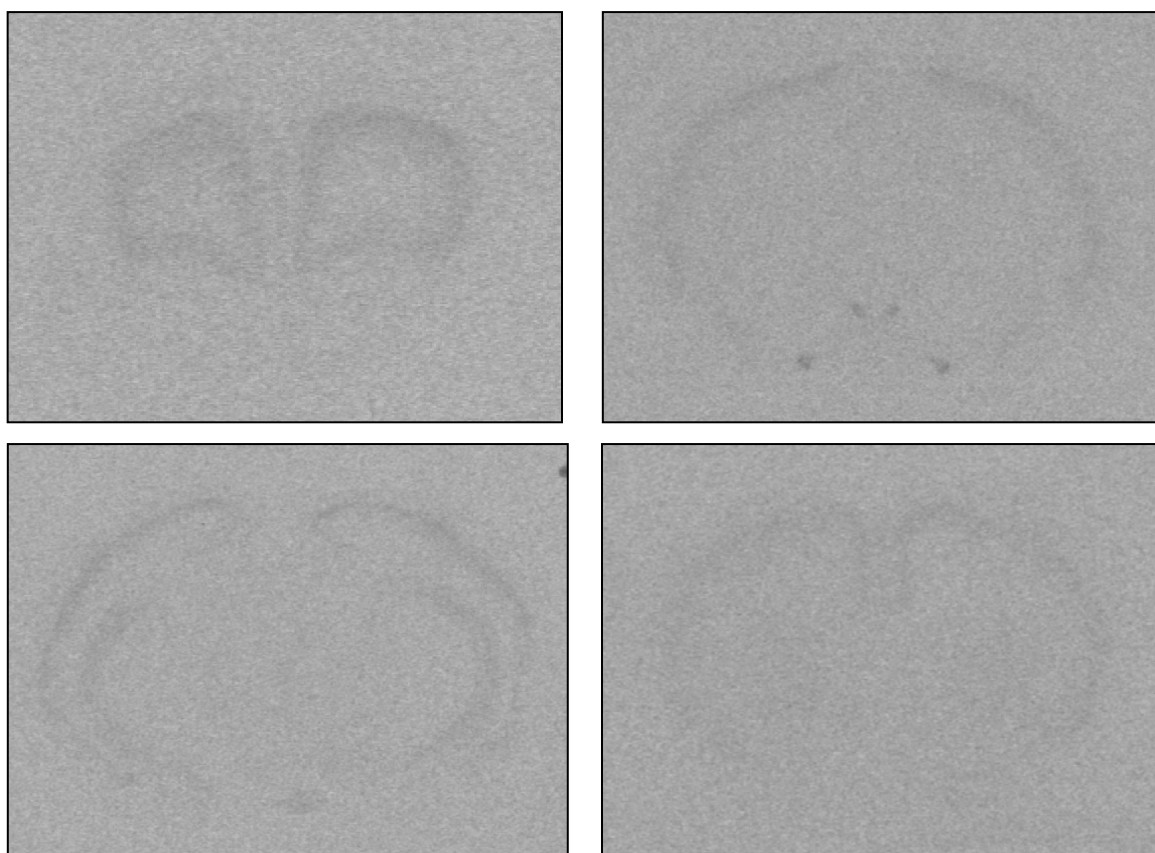


FIGURA 16 - Ilustração da marcação de [^3H]senktide em receptores NK3 no cérebro de ratos, cortes coronais desde o bulbo olfatório ao tronco encefálico. Observa-se a baixa densidade da marcação, quanto mais escura a região, maior a densidade da ligação do radioligante.

TABELA 3 – Ligação de [³H]senktide nos receptores NK3 após 96 horas de privação de sono paradoxal e 24 horas de rebote.

Estrutura cerebral	CTRL (n=9)			PSP 96H (n=9)			PSP 96H + REB 24H (n=9)		
Córtex									
Associação frontal									
Lâmina externa	0,39	±	0,10	0,36	±	0,08	0,39	±	0,04
Lâmina interna	0,04	±	0,02	0,05	±	0,04	0,05	±	0,01
Cíngulo									
Lâmina externa	0,12	±	0,05	0,11	±	0,06	0,11	±	0,01
Lâmina interna	0,27	±	0,08	0,24	±	0,07	0,24	±	0,01
Somatosensorial primário	0,19	±	0,08	0,17	±	0,07	0,20	±	0,01
Parietal de associação	0,22	±	0,07	0,24	±	0,06	0,24	±	0,03
Entorrinal	0,10	±	0,05	0,13	±	0,05	0,14	±	0,04
Núcleo supraóptico	0,55	±	0,13	0,58	±	0,11	0,59	±	0,03
Giro denteado ventral	0,22	±	0,07	0,25	±	0,09	0,26	±	0,02
Núcleo mamilar medial	0,16	±	0,09	0,17	±	0,06	0,16	±	0,04
Núcleo interpeduncular	0,28	±	0,07	0,32	±	0,10	0,30	±	0,02
Núcleo talâmico paraventricular	0,24	±	0,05	0,26	±	0,08	0,29	±	0,04

Os valores estão representados em média ± EP uCi/g tecido
ANOVA, uma via (p>0,05).

O presente estudo demonstrou que a privação de sono paradoxal promoveu mudanças hiperalgésicas na sensibilidade dolorosa, da mesma intensidade, desde as primeiras 24 horas até 96 horas de privação de sono, e que somente o rebote de sono de 48 horas, após 96 horas de privação de sono paradoxal foi capaz de restaurar a latência para os valores basais. A condição da pata, seca ou úmida, foi de extrema importância para avaliação da latência de retirada na pata após um estímulo térmico, sendo que, o grupo que apresentou patas úmidas no momento do teste demonstrou maiores latências em comparação com aquele com as patas secas. Somado a isso, quando foi verificado o efeito da privação total de sono de 6 horas na sensibilidade dolorosa, não foi observada nenhuma alteração significativa. Os estudos envolvendo as suposições dos mecanismos pelos quais a privação de sono paradoxal promove essas alterações demonstraram que a privação de sono paradoxal reduziu o efeito antinociceptivo da morfina, e dos antagonistas NK1 e NK3. No entanto, a possibilidade deste efeito envolver alterações na ligação desses receptores foi analisada, sendo encontrado, então, que a ligação dos receptores μ -opiídeos, NK1 e NK3 permaneceram inalteradas após a privação de sono paradoxal de 96 horas, assim como, durante o período rebote de 24 horas nas áreas analisadas.

A privação de sono tem sido considerada como um fator de risco a saúde porque contribui para o agravamento de muitas doenças (Miller e Bartus, 1982), reduz a longevidade (Kripke et al, 1979) e alterações comportamentais (Tufik et al, 1978; Silva et al, 2004), hormonais (Spiegel et al, 1999; Andersen et al, 2005; Andersen e Tufik, 2006) e neuroquímicas (Farooqui et al, 1996; D'Almeida et al,

1998; Hipólide et al, 2005; 2006) assim como promove alterações na sensibilidade dolorosa (Lautenbacher et al, 2006).

Entre os estudos atuais sobre o efeito da privação de sono na sensibilidade dolorosa, observamos diversas diferenças metodológicas (Moldofsky et al, 1975 Moldofsky e Scarisbrick, 1976; Hicks et al, 1978, 1979; Lentz et al, 1999; Onen et al, 2000, 2001ab; Kunderman et al, 2004ab; Ukponmwan et al, 1984, 1986a; May et al, 2005). Esses estudos utilizaram diferentes métodos e períodos de privação de sono, estímulos, e nos experimentos com animais observamos também utilização de diferentes linhagens, gênero e idade da amostra, assim como, diferentes formas de análise dos dados. Porém, os mecanismos pelos quais a privação de sono paradoxal diminui o limiar nociceptivo parecem complexos e permanecem ainda desconhecidos. Os animais privados de sono paradoxal parecem apresentar alterações nos sistemas mediadores da dor, por exemplo, em alguns sistemas neuroquímicos (Onen et al, 2001a). Não obstante, antes de ser iniciado qualquer estudo na tentativa de investigar esses mecanismos, devido a controversos resultados prévios procuramos no presente estudo padronizar os efeitos da privação de sono, total e parcial; e períodos de privação de sono paradoxal e rebote capazes de promoverem alterações na sensibilidade dolorosa em ratos.

Em relação aos estudos clínicos, nossos dados comportamentais do efeito longitudinal da privação de sono sobre a sensibilidade dolorosa estão de acordo com a maioria desses estudos demonstrando uma alta incidência de alterações hiperalgésicas em condições de privação de sono (Moldofsky et al, 1975

Moldofsky e Scarisbrick, 1976; Lentz et al, 1999; Onen et al, 2001a; Kundermann et al, 2004b). Esses estudos, no entanto, indicam que o sono de ondas lentas seria o responsável pelas alterações na sensibilidade à dor. Moldofsky e colaboradores (1975, 1976), e recentemente, Kundermann e colaboradores (2004b) observaram um aumento significativo de pontos musculares dolorosos e uma redução do limiar de dor em voluntários privados de sono de ondas lentas, em relação aos privados de sono paradoxal.

Entretanto, Onen e colaboradores (2001a) demonstraram que a privação de sono paradoxal foi mais importante para alterar a sensibilidade dolorosa do que a privação do sono de ondas lentas em humanos, o que também foi observado nos dados preliminares de Smith e colaboradores (2005) em mulheres saudáveis. Esses autores demonstraram a importância das diferenças individuais na arquitetura do sono, principalmente no sono paradoxal, em associação com a percepção térmica dolorosa de mulheres saudáveis. Mulheres com maiores latências de sono paradoxal, assim como, com menores porcentagens de sono paradoxal apresentaram maior intensidade de sensação dolorosa. Esses dados são condizentes com os dados encontrados em estudos com animais que implicam o sono paradoxal como chave nesse processo. Em todos eles, animais privados de sono paradoxal apresentaram aumento do limiar nociceptivo, conforme foi observado em nosso estudo (Hicks et al, 1978, 1979; Ukponmwan et al, 1984, 1986a; Onen et al, 2000, 2001a; May et al, 2005).

Segundo estudos de Machado e colaboradores (2004) a privação de sono paradoxal pelo método da plataforma múltipla modificada foi efetiva em produzir

supressão total de sono paradoxal (100%) e significativa diminuição do sono de ondas lentas (31%). Nossos achados sugerem que a redução no limiar de retirada da pata parece ser devido à redução do sono paradoxal. Porém, pelo fato de apenas a privação de sono paradoxal ser, até o momento, estudada em animais, não podemos excluir a importância do sono de ondas lentas nesse processo, tal como se essa alteração é causado pela interrupção da continuidade do sono, não apenas pela falta de sono paradoxal.

Inicialmente, apesar das diferenças metodológicas, apresentamos dados semelhantes aos resultados pioneiros de Hicks e colaboradores (1978, 1979), em que a privação de sono paradoxal promoveu redução do limiar nociceptivo após 24 horas, mantendo a redução até as 96 horas. Esses autores utilizaram choque elétrico nas patas como estímulo nocivo, enquanto utilizamos o teste da placa quente. Da mesma forma, destaca-se que as alterações permaneceram mesmo após a completa recuperação do sono paradoxal, após 24 horas de rebote de sono (Machado et al, 2004). No entanto, a diferença foi que aqueles autores encontraram que somente 96 horas de rebote de sono, após 96 horas de privação de sono paradoxal, foram capazes de retornar a latência de sono para os valores basais, diferente do nosso estudo que encontrou que 48 horas de rebote, após 96 horas de privação de sono paradoxal já foi suficiente.

Nossos achados estão também de acordo com os achados de Onen e colaboradores (2001b) quanto ao efeito da privação de sono paradoxal na sensibilidade térmica, mas não com o seu estudo anterior (Onen et al, 2000). Neste estudo, Onen e colaboradores (2000) observaram que somente após 48

horas de privação de sono paradoxal poderia ser observada alguma alteração no limiar de nociceptivo, observado por meio do do limiar de vocalização após aplicação de um estímulo nocivo mecânico na pata, assim como também mostrou que durante o período rebote a alteração na sensibilidade dolorosa retornava para os valores basais, rapidamente após 24 horas. Essa diferença não pode ser explicada pelo método de avaliar o limiar nociceptivo, uma vez que em seu estudo posterior Onen e colaboradores (2001b) demonstram que a privação de sono paradoxal promoveu alteração semelhante para estímulos térmico e mecânico; podendo ser atribuída, então, ao fato de os autores terem utilizado o método da plataforma única para privação de sono paradoxal e em nosso estudo foi utilizado o método da plataforma múltipla modificada, no qual é permitido aos animais contato social com outros animais no tanque.

É importante chamar atenção para o fato de o rebote de 24 horas não ter sido suficiente para retornar os valores de latência para os valores basais. Esse período reduziu a latência de retirada da pata tanto quanto a privação de sono. Entretanto, Machado e colaboradores (2004) mostraram que após 24 horas de rebote de sono houve recuperação total do sono paradoxal. O fato de a sensibilidade à dor permanecer alterada após a completa recuperação do sono leva a especulação de um possível efeito contínuo e em longo prazo da privação de sono paradoxal.

O fenômeno de rebote de sono paradoxal ocorre quando se permite o sono de voluntários ou de animais após um período de privação (Morden et al, 1967). Onen e colaboradores (2000) observaram também, em estudos com animais, que

o rebote de sono de 24 horas reverteu a latência de dor para os níveis basais após um estímulo nocivo em ratos privados de sono paradoxal. Esses autores observaram o efeito da privação de sono quando os animais estavam com as patas em condições úmidas, comparado a um basal que estava com patas secas.

A respeito da condição da pata, na tentativa de esclarecer a suposição de Onen e colaboradores (2000), o estudo do efeito longitudinal foi realizado paralelamente com os animais com as patas secas e outro grupo de animais com as patas úmidas, no momento da avaliação do limiar nociceptivo. Observamos que os animais com as patas úmidas apresentaram maiores latências do que aqueles com as patas secas, ao longo dos tempos de privação de sono. Este fato demonstra que a condição da pata é de fundamental importância no momento do teste, podendo justificar as diferenças entre os diversos estudos.

Os efeitos hiperalgésicos encontrados após a privação de sono paradoxal contrastam com dois outros estudos, Asakura e colaboradores (1992) e Dametto e colaboradores (2002). O primeiro estudo não demonstrou alteração na latência de retirada da pata pelo método da placa quente após 48 horas de privação de sono paradoxal. O segundo estudo mostrou aumento do limiar de vocalização após um estímulo elétrico após 96 horas de privação de sono paradoxal (Dametto et al, 2002). Ressalta-se que esses dois estudos não tiveram como foco principal a nocicepção, sendo esta avaliada secundariamente. A diferença pode ser explicada pelo fato de Asakura e colaboradores (1992) terem utilizado camundongos e uma temperatura elevada da placa quente, o que representa mais uma resposta reflexa; e Dametto e colaboradores (2002) apesar de utilizarem também o método

da plataforma múltipla modificada, utilizaram como estímulo nociceptivo o limiar de vocalização após choque elétrico de 1 mA nas patas de ratos, ao invés de estímulo nocivo térmico.

A diferença entre os estudos anteriores também pode ser o grupo controle utilizado. Optamos em não utilizar como controle a plataforma larga devido evidências de Machado e colaboradores (2004) que observaram que a plataforma larga também reduz consideravelmente o sono paradoxal (77%) e também 26% de sono de ondas lentas após 96 horas de privação de sono (Machado et al, 2004); assim como nos estudos de May e colaboradores (2005) que relataram uma redução do limiar nociceptivo também com a plataforma larga. Portanto, para o presente estudo foi escolhido como grupo controle os animais que permaneceram na gaiola com serratagem.

Outra controvérsia pode ser atribuída ao tempo e ao método de privação de sono capaz de causar as alterações hiperalgésicas. O estudo recente de Roehrs e colaboradores (2006) levantou, pela primeira vez, a hipótese de que uma pequena redução de 4 horas no tempo de sono já poderia promover aumento da dor em voluntários saudáveis, especialmente a devido à redução de sono paradoxal. De fato, 6 horas de privação total de sono em animais é suficiente para promover alterações significativas no ciclo vigília-sono. Após esse período de privação de sono os animais dormem logo que se inicia o período rebote demonstrando que, esse período de privação é importante e pode promover rebote de sono, principalmente de sono paradoxal (Ugalde et al, 1994). Contudo, apesar da privação total de sono promover alteração no *turnover* (Asikainen et al, 1997) e a

na liberação (Grossman et al, 2000) de mediadores envolvidos no processamento da dor como a serotonina em diversas áreas cerebrais, demonstramos que este tempo PTS parece não ser essencial para causar uma diminuição de sono suficiente para promover alteração no limiar nociceptivo após um estímulo térmico.

No presente estudo foi utilizado o estímulo térmico para avaliar a sensibilidade dolorosa por meio da utilização da placa quente. Este método tem sido frequentemente utilizado para avaliar a resposta nociceptiva em animais representado pelo tempo em que o animal permanece na placa aquecida a 50°C até haver a retirada da pata (Eddy e Leim Bach, 1953; Espejo e Mir, 1992; Vermeirsch e Meert, 2004; Johnston e Westbrook, 2003). A temperatura foi escolhida de acordo com os estudos de Vermeirsch e Meert (2004), Bolles e Fanselow (1982) e com o estudo de May e colaboradores (2005) ao quais demonstraram que a privação de sono paradoxal promoveu alterações no limiar nociceptivo somente quando baixas temperaturas foram utilizadas possivelmente por meio da ativação de nociceptores C. Esses autores utilizaram a temperatura de 44°C, no entanto, podem ser observados valores de latências similares (em segundos) ao nosso presente estudo. As fibras nociceptivas C modulam respostas nociceptivas que tipicamente requerem uma estimulação mais sustentada, promovendo uma elevada latência basal para a retirada da pata em comparação com a forte estimulação das fibras A, compatível com estímulos térmicos de alta temperatura como a 55°C. Nesta, pode ser observada uma rápida resposta, ou seja, baixas latências de dor semelhantes em segundos à respostas mais reflexas as quais são resistentes ao efeito dos opióides, e não apenas diminuição do limiar

nociceptivo que caracterize mudanças hiperalgésicas (May et al, 2005). Este termo “mudanças hiperalgésicas” não descreve um processo fisiopatológico, mas a direção das mudanças na sensibilidade dolorosa após a privação ou fragmentação do sono.

Contudo, as outras formas de sensibilidade não parecem estar alteradas. Kundermann e colaboradores (2004a) observaram que apesar da privação de sono promover alteração no limiar nociceptivo a estímulos térmicos não promoveu modificações na sensibilidade geral a estímulos térmicos não-nocivos, sugerindo que os mecanismos parecem envolver alterações diretamente nas vias de processamento nociceptivo.

A primeira tentativa de investigação sobre os mecanismos pelos quais a privação de sono promove hiperalgesia em humanos foi inicialmente levantada por Older e colaboradores (1999), esses autores submeteram pacientes saudáveis a três dias de privação de sono de ondas lentas e verificaram a possibilidade de alterações hormonais estarem mediando as alterações no sono e as subsequentes queixas dolorosas nos voluntários. Esses autores testaram se o fator de crescimento tipo-insulina (IGF-1) sérico teria participação neste processo. Essa hipótese foi baseada no fato de pacientes com fibromialgia apresentarem níveis reduzidos desse mediador no sangue. No entanto, não foram encontradas alterações nos níveis de IGF-1 nos voluntários submetidos à privação de sono de ondas lentas.

Previamente, em animais já havia sido levantada a hipótese da participação do sistema opióidérgico nesse processo (Hicks et al, 1978). Apesar de alguns

estudos demonstrarem o efeito da privação de sono sobre a sensibilidade dolorosa, desde os primeiros estudos conduzidos por Hicks e colaboradores na década de 70 (1978, 1979), apenas poucos estudos deram enfoque as suposições de Hicks sobre um possível envolvimento do sistema opióide nesse processo (Ukponmwan et al, 1984, 1986a).

Ukponmwan e colaboradores (1984, 1986a) demonstram uma completa redução do efeito analgésico da morfina em animais privados de sono paradoxal. Nesta investigação os autores relataram também que 96 horas de privação de sono paradoxal aboliu as propriedades analgésicas da fosforamidona (um inibidor de encefalinase). De acordo com os nossos dados, quando os animais foram tratados com morfina, após um período de privação de sono paradoxal, observamos um bloqueio do efeito analgésico desta droga, mas somente após o uso de doses regulares de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg. Essa alteração permaneceu até mesmo após a restauração do sono paradoxal com 24 horas de rebote.

A morfina apresentou analgesia em animais privados de sono quando utilizada em doses altas (10 mg/kg), o que nos leva a inferir que para o tratamento de condições dolorosas que envolvem um sono fragmentado, a dose de opióides deveria ser aumentada para um melhor efeito. Entretanto, altas doses de morfina, além de apresentarem um maior risco de dependência e piora importante com a retirada (Celerier et al, 2001), apresentam efeitos tóxicos como acinesia. Os animais catatônicos apresentam uma maior latência de resposta ao estímulo térmico nociceptivo na placa quente devido a alterações motoras simulando, então, analgesia (Winters et al, 1988).

Historicamente o sistema opioidérgico tem sido envolvido nas vias centrais de processamento da dor (Prezewelocki, 1984). Alguns grupos têm demonstrado que a estimulação dolorosa promove alterações nos receptores opióides em algumas áreas cerebrais envolvidadas no sistema nociceptivo em animais (Zubieta et al, 2001; Bencherif et al, 2002; Sprenger et al, 2006). Esse sistema envolvido tanto na inibição (Sora et al, 1997) quanto na facilitação da dor (Bencherif et al, 2002) tem sido relacionado, também, com a regulação do ciclo vigília-sono. King e colaboradores (1981) observaram que a administração de beta-endorfina e morfina produzia insônia, uma vez que inibia o sono de ondas lentas e suprimia totalmente o sono paradoxal. Entretanto, o pré-tratamento com naloxona, apesar de reverter as alterações no sono de ondas lentas, não antagonizou o efeito supressor sobre o sono paradoxal, implicando o sistema opioidérgico como elemento chave na regulação do ciclo vigília-sono. Esses estudos foram seguidos por outro que demonstrou aumento de beta-endorfina plasmática, além de uma pequena diminuição encontrada no hipotálamo de animais submetidos a 72 horas de privação de sono paradoxal (Przewlocka et al, 1986).

Os opióides atuam por meio de receptores μ , δ e κ , os quais têm sido clonados e imunohistoquimicamente mapeados no diencéfalo e telencéfalo em associação com o sistema sensorial, límbico e neuroendócrino (Vaccarino et al, 1999). Na tentativa de entender a função desses diferentes receptores sobre o processamento nociceptivo e na analgesia produzida pela morfina, estudos realizados com animais *knockout* de receptores μ -opióides têm observado que esses animais apresentam um limiar nociceptivo térmico reduzido, e que esses

receptores teriam uma importante função na analgesia induzida pela morfina tanto a nível espinhal quanto supra-espinhal (Sora et al, 1997). Esses achados reforçam que a ausência ou uma redução da expressão desses receptores μ -opioides podem ser importantes em condições dolorosas crônicas e conduzem para a hipótese de que essas alterações podem promover hiperalgesia (Willis and Westlund, 1997).

Em relação a função dos receptores opioides e de opioides endógenos durante experiências de dor sustentada, Zubieta e colaboradores (2001) detectaram a ativação de receptores μ -opioides na região anterior do cíngulo, bilateralmente no córtex pré-frontal, na ínsula, tálamo e hipotálamo contra-lateral ao local do estímulo nociceptivo, e ipsilateralmente na amígdala; a qual mediada a resposta nociceptiva possivelmente por meio de conexões diretas com a substância cinzenta periaquedutal (Manning, 1998).

Um outro fato que deve ser enfatizado são as observações de que a morfina utilizada cronicamente produz diminuição do tempo de sono paradoxal, produzindo privação de sono; e também produz, em longo prazo, hiperalgesia em ratos após a sua retirada (Celerier et al, 2001). Essa alteração pode ser resultado de uma sensibilização do sistema pró-nociceptivo ou uma possível alteração no sistema inibitório descendente, predominantemente opioidérgico.

Como observado previamente, a morfina produz analgesia diretamente por meio da ativação de receptores opioides, principalmente μ , e indiretamente influenciando a liberação de opioides endógenos (Sora et al, 1997). A privação de sono paradoxal parece promover uma inibição da síntese de proteínas (Shapiro e

Girdwood, 1981), assim como pode modificar os receptores μ -opioides em algumas áreas cerebrais, como o sistema límbico, possibilitando o envolvimento do sistema opioide na síndrome comportamental decorrente da privação de sono paradoxal (Fadda et al, 1991). Em uma tentativa de melhor investigar essa possível participação da alteração da ligação dos receptores μ -opioides nesse processo nós conduzimos um estudo autorradiográfico utilizando o radioligante [3 H]DAMGO em animais privados de 96 horas de sono paradoxal e após 24 horas rebote de sono. Porém, de acordo com nossos resultados, não encontramos alteração significativa na ligação desses receptores em nenhuma região analisada, foram analisadas em detalhes as regiões envolvidas no processamento nociceptivo como o córtex frontal, cíngulo, amígdala e córtex sensorial primário, dentre outras, mas nenhuma alteração significativa foi encontrada.

Pode ser especulado que uma alteração na secreção de opioides poderia promover uma regulação compensatória desses receptores, e consequentemente aumentar ou diminuir a resposta à administração de opioides. Uma vez que nenhuma alteração na ligação desses receptores nas áreas investigadas foi encontrada, parece improvável que a redução do efeito analgésico após um período de privação de sono paradoxal seja devido a dessensibilização farmacológica, ou seja, a uma redução da ligação dos receptores μ -opioides. Contudo, a possibilidade do envolvimento do sistema opioide não pode ser excluída. Podem existir outras alterações não refletidas especificamente na distribuição dos receptores que possam ser responsáveis pelo bloqueio do efeito analgésico da morfina após a privação de sono.

Alguns dados levantam a participação de outros sistemas de neurotransmissores, como os receptores serotoninérgicos (5-HT₂ e 5-HT₃) no tronco encefálico, modulando a transmissão opioidérgica na via inibitória descendente desde a substância cinzenta periaquedutal (Kiefel et al, 1992). Os sistemas opioidérgico e serotoninérgico são interconectados e podem interagir na modulação e na produção de diversas alterações comportamentais inclusive a nocicepção (Yang et al, 1994). Além disso, existem evidências de que camundongos *knockout* de receptores NK1 da substância P são insensíveis aos efeitos analgésicos dos opióides (Murtra et al, 2000; Ripley et al, 2002). Neste contexto, essas evidências conduzem a suposição de que outros sistemas podem estar envolvidos e deveriam ser melhores estudados.

Diversas pesquisas, no intuito de comprovar as ações biológicas das taquicininas têm focado os efeitos de agonistas dos receptores NK. De fato, a utilização de um antagonista desses receptores promove uma melhor compreensão da função fisiológica das taquicininas, principalmente com a introdução de novos antagonistas não-peptídicos seletivos dos receptores NK1, NK2 e NK3 das taquicininas (Regoli et al, 1989; Maggi et al, 1993; Gehlert et al, 1996).

Estudos envolvendo a seletividade da substância P por receptores NK1 têm atraído um maior interesse, uma vez que esse receptor tem uma expressão predominante no cérebro humano, juntamente aos receptores NK3, enquanto que a expressão dos receptores NK2 é reduzida (Saffroy et al, 2003).

O sistema SP-érgico, tanto central como periféricamente, está envolvido na

fisiopatologia da dor (Iversen, 1982; Otsuka e Yoshioka, 1993; Maggi et al, 1992). A maioria dos estudos envolve os receptores periféricos e medulares nesse processo, no entanto, nas últimas décadas, tem sido melhor observada a distribuição central e a participação dos receptores NK1 e NK3 de regiões envolvidas com o processamento nociceptivo, como no córtex frontal e sensorial, sistema límbico, tálamo, tronco cerebral em coexistência inclusive com outros neurotransmissores como as monoaminas no tronco encefálico (Chan-Palay et al, 1978; Iversen, 1982; Brodin et al, 1987) têm sido melhor estudado a participação dos receptores centrais. Os neurônios da região caudal dos NR apresentam projeções descendentes para a medula espinal se estendendo até a região terminal dessas projeções na medula espinhal e parecem ser importantes no processamento nociceptivo (Chan-Palay et al, 1978; Pernow, 1983; Brodin et al, 1987; Vaeroy et al, 1988; Otsuka e Yoshioka, 1993).

Laird e colaboradores (2000) observaram dor visceral e hiperalgesia em animais *knockout* de receptores NK1. Esses autores observaram que a atividade da substância P nos receptores NK1 tem um papel fundamental no processamento nociceptivo, propondo inclusive que um dos mecanismos capazes de iniciar hiperalgesia seria dependente de receptores NK1 no sistema nervoso central.

No que se refere ao envolvimento do sistema SP-érgico na produção de hiperalgesia, ressalta-se também o estudo de Cridland e Henry (1988) os quais observaram que os receptores NK1 teriam uma importante participação nesse processo. Esses dados são complementares com os dados de McLeod e

colaboradores (1999) através dos quais esses autores observaram alodínea e hiperalgesia em animais que apresentavam uma maior expressão de substância P, ou seja, latência basal de retirada da cauda, após um estímulo mecânico, foi significativamente menor do que os animais controle. Ainda, a participação dos receptores NK1 pôde ser também evidenciada pelo bloqueio da hiperalgesia produzida por estímulo térmico na cauda com a administração prévia de antagonista de receptores NK1 (Yashpal et al, 1995). Porém, este antagonista não apresentou efeito nas medidas basais, ou seja, efeito analgésico.

Os nossos dados comportamentais observaram que o antagonista NK1 apresentou atividade analgésica na dose intermediária nos animais do grupo controle. Porém, não foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pela privação de sono paradoxal, tendo seu efeito analgésico abolido pela privação de sono. Alteração que se manteve até mesmo após 24 horas de rebote de sono.

Quanto ao efeito analgésico dos antagonistas NK1, Seguin e colaboradores (1995) demonstraram, em contradição aos estudos de Yashpal e colaboradores (1995) que essas drogas apresentam atividade analgésica em animais, inclusive comparada a muitas outras como os antiinflamatórios não-hormonais.

Também se acredita que o receptor NK3 apresenta um papel fundamental na neurobiologia da nocicepção. Esses receptores são sítios de ligação da neuroquinina A, no entanto, podem ser sítios também da substância P. Zaratin e colaboradores (2003) observaram que uma droga antagonista desses receptores preveniu a hiperalgesia térmica em ratos monoartríticos principalmente pelo bloqueio da liberação da substância P no sistema nervoso central. Porém, esses

autores não observaram alteração no limiar nociceptivo no controle. No nosso estudo o NK3 apresentou efeito analgésico, elevando o limiar nociceptivo no grupo controle, mas não bloqueou a hiperalgesia induzida por privação de sono paradoxal, ou seja, não apresentou efeito analgésico em animais privados de sono paradoxal. Essa droga apresentou comportamento diferente das outras, morfina e antagonista NK1, devido o grupo rebote na dose intermediária ter conseguido reverter a hiperalgesia induzida pela privação de sono, demonstrando que o rebote de sono paradoxal pode apresentar um efeito na atividade de receptores NK3.

Numa tentativa de elucidar se alterações na ligação dos receptores centrais poderiam estar envolvidas na hiperalgesia produzida pela privação de sono paradoxal, um estudo autorradiográfico foi conduzido com o objetivo de verificar se a ligação dos receptores NK1 e NK3 envolvidos na nocicepção estaria alterada no cérebro de ratos privados de sono paradoxal e rebote. No entanto, não observamos alterações em diversas regiões estudadas. O que nos leva a sugerir que os receptores periféricos ou medulares podem estar envolvidos, ou outras alterações no sistema neuroquímico que não se refletiram diretamente na ligação dos receptores, possam ser responsáveis pela redução do efeito analgésico dos antagonistas de receptores NK1 e NK3 após um período de privação de sono paradoxal.

A substância P e principalmente seus receptores NK1 têm sido implicada na fisiopatologia de algumas doenças nas quais coexistem dor crônica e um sono fragmentado, como a fibromialgia. Nessa síndrome os níveis líquóricos de

substância P estão elevados e podem indicar que este neurotransmissor também centralmente é importante na fisiopatologia desta alteração (Vaeroy et al, 1988; Russell et al, 1994).

Os efeitos centrais da substância P no ciclo vigília-sono em animais foram investigados por Andersen e colaboradores (2006). Esses autores verificaram que a substância P, administrada via intracerebroventricular, causou alterações no ciclo vigília-sono, quando produziu uma maior fragmentação do sono com um maior número de despertares, uma redução do tempo total de sono que permaneceu até 48 horas após administração única de substância P. Esse estudo conclui que a substância P apresenta um importante papel na regulação do ciclo vigília-sono provavelmente via receptor NK1. Esses dados estão de acordo com estudos em humanos (Lieb et al, 2005) que inferem que a substância P promove alterações no sono após a administração sistêmica.

É importante observar que há evidências da participação de outros sistemas de neurotransmissores. Amann e Schuligoi (2004) demonstraram o envolvimento de agonistas beta-adrenérgicos na produção de fator de crescimento de nervo induzido após a administração cutânea de capsaicina, que é dependente da ativação de receptores NK1. Em um outro estudo, Jasmin e colaboradores (2002) mostraram a participação do sistema noradrenérgico na hiperalgesia induzida pela substância P, uma vez que observaram que animais com ausência de noradrenalina no sistema nervoso central apresentaram hiperalgesia e redução dos efeitos analgésicos da morfina.

Não apenas o sistema adrenérgico, mas o GABAérgico parece apresentar um relação com a atividade da substância P. Em 1977, Brownstein demonstrou que os tratos GABAérgicos e de SP-érgicos apresentavam trajetos semelhantes no tronco cerebral, sendo que o GABA inibe a liberação de substância P, enquanto que antagonista GABAérgicos aumentam.

Células enterocromafins que contêm monoaminas apresentam uma série de peptídeos biologicamente ativos, incluindo a substância P. Mais surpreendente tem sido observações de que elas coexistem no sistema nervoso central (Brodin et al, 1987). Neurônios da região caudal dos núcleos da rafe apresentam projeções descendentes para a medula espinal e a coexistência de substância P e serotonina parece se estender na região terminal destas projeções (Iversen, 1982; Vaeroy et al, 1988; Otsuka e Yoshioka, 1993).

A substância P também coexiste em processos patológicos com outros neuromoduladores como interleucinas, neuropeptídeos Y e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. Esses têm sido encontrados em altos níveis no líquido sinovial de pacientes artríticos e na articulação temporomandibular de pacientes com disfunção nesta articulação (Kopp, 2001) e em pacientes com fibromialgia (Vaeroy et al, 1988), em associação com a hiperalgesia, alodínea e dor espontânea encontrada nesses pacientes.

Em síntese, os mecanismos responsáveis pelas alterações na sensibilidade dolorosa após um período de privação de sono são complexos e deveriam ser melhor investigados devido à atividade analgésica de alguns compostos ser dependente de um sono inalterado. Nossos dados não permitem concluir sobre a

participação do sistema opioide e SP-érgico neste processo, contudo, indicam que alterações nesses receptores parecem não ser o principal mecanismo. Porém, a participação desses sistemas não pode ser excluída uma vez que foi observada a redução da atividade analgésica desses compostos após a privação de sono e até mesmo após o período rebote. Finalmente, esses dados sugerem que novos estudos devam ser realizados na tentativa de melhor entender essa relação, que pode contribuir para o controle da dor e de patologias que envolvem um sono fragmentado. Nesse sentido, faz-se mandatória a investigação da participação de outros sistemas de neurotransmissores, fatores neuroendócrinos e neuroimunológicos; assim como, quais partes das vias da dor possam estar alteradas e que contribuem para manutenção desse ciclo vicioso, que consiste em distúrbios de sono causando dor e dor que contribui para progressiva piora da qualidade de sono.

De acordo com os dados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a privação de sono paradoxal promoveu redução do limiar nociceptivo, que se manteve mesmo após a recuperação do sono paradoxal. O efeito analgésico demonstrado pelas drogas utilizadas foi reduzido em animais privados de sono paradoxal, no entanto, sem mostrar alteração significativa da ligação de receptores μ -opióides, NK1 e NK3 no cérebro de ratos. Apesar disso, não pode ser excluída a participação desses sistemas na hiperalgesia induzida pela privação de sono paradoxal.

1. Agargun MY, Tekeoglu I, Gunes A, Adak B, Kara H, Ercan M. Sleep quality and pain threshold in patients with fibromyalgia. *Compr Psychiatry*. 1999;40:226-8.
2. Alberti A. Headache and sleep. *Sleep Med Rev* 2006. 25 no prelo
3. Amann R, Schuligoi R. Beta adrenergic inhibition of capsaicin-induced, NK1 receptor-mediated nerve growth factor biosynthesis in rat skin. *Pain* 2004;112:76-82.
4. Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 2005;14:83-90
5. Andersen ML, Nascimento DC, Machado RB, Luk WP, Moldofsky H, Tufik S. Substance P and Sleep: Interactions of between tachykinin and sleep-wake mechanisms. *Behav Brain Res* 2006;167:212-8.
6. Andersen ML, Tufik S. Altered sleep and behavioral patterns of arthritic rats. *Sleep Res Online* 2000;3:161-7.
7. Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res Rev* 2006;51:136-43.
8. Andersen ML, Tufik S. Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve. *Brain Res*. 2003;984:84-92.
9. Arima T, Svensson P, Rasmussen C, Nielsen KD, Drewes AM, Arendt-Nielsen L. The relationship between selective sleep deprivation, nocturnal jaw-muscle activity and pain in healthy men. *J Oral Rehabil* 2001;28:140-8.

10. Asakura W, Matsumoto K, Ohta H, Watanabe H. REM sleep deprivation decreases apomorphine-induced stimulation of locomotor activity but not stereotyped behavior in mice. *Gen Pharmacol* 1992;23:337-41.
11. Asikainen M, Toppila J, Alanko L, Ward DJ, Stenberg D, Porkka-Heiskanen T. Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the rat. *Neuroreport* 1997;8:1577-82.
12. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol* 1978;4:451-62.
13. Bederson JB, Fields HL, Barbaro NM. Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. *Somatosens* 1990;7:185-203.
14. Behbehani MM, Jiang MR, Chandler SD, Ennis M. The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain* 1990;40:195-204.
15. Bencherif B, Fuchs PN, Sheth R, Dannals RF, Campbell JN, Frost JJ. Pain activation of human supraspinal opioid pathways as demonstrated by [¹¹C] carfentanil and positron emission tomography (PET). *Pain* 2002;99:589-98.
16. Bennett RM. Beyond fibromyalgia: Ideas on etiology and treatment. *J Rheumatol* 1989;16:185-91.
17. Boardman HF, Thomas E, Millson DS, Croft PR. Psychological, sleep, lifestyle, and comorbid associations with headache. *Headache* 2005. 45:657-69.

18. Bolles RC, Fanselow MS. Endorphins and behavior. *Annu Rev Psychol.* 1982;33:87-101.
19. Brentegani LG, Brentegani MR, Lico MC. Dental pain and sleep. Experimental study on guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Braz Dent J* 1992;2:129-33.
20. Brodin E, Ogren SO, Theodorsson-Norheim E. Effects of subchronic treatment with imipramine, zimelidine and alaproclate on regional tissue levels of substance P and neurokinin A/neurokinin B-like immunoreactivity in the brain and spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 1987;26:581-90.
21. Brownstein MJ. Studies of the distribution of biologically active peptides in the brain. *Adv Exp Med Biol* 1977;87:41-8.
22. Carli G, Montesano A, Rapezzi S, Paluffi G. Differential effects of persistent nociceptive stimulation on sleep stages. *Behav Brain Res* 1987;26:89-98.
23. Celerier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 2001;21:4074-80.
24. Chan-Palay V, Jonsson G, Palay SL. Serotonin and substance P co-exist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc Nat Acad Sci USA* 1978;75:1582-6.
25. Cridland RA, Henry JL. Facilitation of the tail-flick reflex by noxious cutaneous stimulation in the rat: antagonism by a substance P analogue. *Brain Res* 1988 Oct;462:15-21.

26. D'Almeida V, Lobo LL, Hipolide DC, de Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 1998;9:2853-6.
27. Dam TV, Escher E, Quirion R. Visualization of neurokinin-3 receptor sites in brain using the highly selective ligands [3h]senktide. *Brain Res* 1990;506:175-9.
28. Dametto M, Suchecki D, Bueno OF, Moreira KM, Tufik S, Oliveira MG. Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behav Brain Res* 2002;129:171-8.
29. Drewes AM, Svendsen L, Taagholt SL, Bjerregard K, Nielsen KD, Hansen B. Sleep in rheumatoid arthritis: a comparison with healthy subjects and studies of sleep/wake interactions. *Br J Rheumatol* 1998;37: 71-81.
30. Eddy NB, Leim Bach D. Synthetic analgesics III. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmac Exp Therap* 1953;107:385-93.
31. Espejo EF, Mir D. Differential effects of weekly and daily exposure to the hot plate on the rat's behavior. *Physiol Behav* 1994;55:1157-62 .
32. Espejo EF, Stinus L, Cador M, Mir D. Effects of morphine and naloxone on behaviour in the hot plate test: an ethopharmacological study in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;113:500-10.
33. Fadda P, Tortorella A, Fratta W. Sleep deprivation decreases mu and delta opioid receptor binding in the rat limbic system. *Neurosci Letter* 1991;129:315-7.

34. Farooqui SM, Brock JW, Zhou J. Changes in monoamines and their metabolite concentrations in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:385-91.
35. Field MJ, McCleary S, Boden P, Suman-Chauhan N, Hughes J, Singh L. Involvement of the central tachykinin NK1 receptor during maintenance of mechanical hypersensitivity induced by diabetes in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285(3):1226-32.
36. Foo H, Mason P. Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep Med Rev* 2003;7:145-54.
37. Friedrichs ES. Pain and Sleep. *Wis Med J* 1997;96: 8-9.
38. Gaudreau GA, Plourde V. Role of tachykinin NK1, NK2 and NK3 receptors in the modulation of visceral hypersensitivity in the rat. *Neurosci Lett* 2003;351:59-62.
39. Gehlert DR, Schober DA, Hipkind PA, Gitter BD, Howbert JJ. [3H] LY303870, a novel nonpeptide radioligand for the NK1 receptor. *J Neurochem* 1996;66:1095-102.
40. Gitter BD, Bruns RF, Howbert JJ, Waters DC, Threlke PG, Cox LM, et al. Pharmacological characterization of LY303870: a novel, potent and selective nonpeptide substance P (neurokin-1) receptor antagonist. *J pharmacol Exp Therap* 1995;275:737-44.
41. Grossman GH, Mistlberger RE, Antle MC, Ehlen JC, Glass JD. Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 2000;11:1929-32.

42. Guard S, Watson SP. Tachykinin receptor types: classification and membrane signaling mechanisms. *Neurochem Int* 1991;18:149-65.
43. Haythornthwaite JA, Hegel MT, Kerns RD. Development of a sleep diary for chronic pain patients. *J Pain Symptom Manage* 1991;6:65-72.
44. Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL. Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience* 1992;48:533-43.
45. Hicks RA, Coleman DD, Ferrante F, Sahatjian M, Hawkins J. Pain thresholds in rats during recovery from REM sleep deprivation. *Percept Mot Skills* 1979;48:687-90.
46. Hicks RA, Moore JD, Findley P, Hirshfield C, Humphrey V. REM sleep deprivation and pain thresholds in rats. *Percept Mot Skills* 1978;47:848-50.
47. Hipólido DC, Moreira KM, Barlow KB, Wilson AA, Nobrega JN, Tufik S. Distinct effects of sleep deprivation on binding to norepinephrine and serotonin transporters in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:297-303.
48. Hipólido DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol* 2006;18:231-8.
49. Horne JA, Shackell BS. Alfa-like EEG activity in non-REM sleep and the fibromyalgia (fibrositis) syndrome. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1991; 79:271-6.

50. Iversen LL. Substance P. *Medical bull* 1982;38:277-82.
51. Jasmin L, Tien D, Weinshenker D, Palmiter RD, Green PG, Janni G, Ohara PT. The NK1 receptor mediates both the hyperalgesia and the resistance to morphine in mice lacking noradrenaline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1029-34.
52. Johnston IN, Westbrook RF. Acute and conditioned sickness reduces morphine analgesia. *Behav Brain Res* 2003;142:89-97.
53. Kaplan H, Fields HL. Hyperalgesia during acute opioid abstinence:evidence for a nociceptive facilitating function of the rostral ventromedial medulla. *J Neurosci* 1991;11:1433-39.
54. Kiehl JM, Cooper ML, Bodnar RJ. Serotonin receptor subtype antagonists in the medial ventral medulla inhibit mesencephalic opiate analgesia. *Brain Res* 1992;597:331-8.
55. King C, Masserano JM, Codd E, Byrne WL. Effects of beta-endorphin and morphine on the sleep-wakefulness behavior of cats. *Sleep* 1981;4:259-62.
56. Kingery WS, Davies MF, Clark JD. A substance P receptor (NK1) antagonist can reverse vascular and nociceptive abnormalities in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Pain* 2003;104:75-84.
57. Kopp S. Neuroendocrine, immune, and local responses related to temporomandibular disorders. *J Orofac Pain* 2001;15:9-28.
58. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Shamek JJ, et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 1998;281:1640-45.

59. Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC. Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Arch Gen Psychiatry*. 1979;36:103-16.
60. Kundermann B, Krieg JC, Schreiber W, Lautenbacher S. The effect of sleep deprivation on pain. *Pain Res Manag* 2004a;9:25-32.
61. Kundermann B, Sernal J, Huber MT, Krieg JC, Lautenbacher S. Sleep deprivation affects thermal pain thresholds but not somatosensory thresholds in healthy volunteers. *Psychosom Med* 2004b;66:932-7.
62. Laird JM, Olivar T, Roza C, De Felipe C, Hunt SP, Cervero F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuroscience* 2000;98:345-52.
63. Laird JMA, Hargreaves RJ, Hill RG. Effect of RP67580, a non-peptide neurokinin-1 receptor antagonist, on facilitation of a nociceptive spinal flexion reflex in the rat. *Br J Pharmacol* 1993;109:713-18.
64. Landis CA, Levine JD, Robinson CR. Decreased slow-wave and paradoxical sleep in the rat chronic pain model. *Sleep* 1989;12:167.
65. Langlois X, Wintmolders C, Riele P, Leysen E, Jurzak M. Detailed distribution of neurokinin 3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain: a comparative autoradiographic study. *Neuropharmacology* 2001;40:242-53.
66. Lautenbacher S, Kundermann B, Krieg JC. Sleep deprivation and pain perception. *Sleep Med Rev* 2005. In press.
67. Lavigne GJ, Velly-Miguel AM, Montplaisir J. Muscle pain, dyskinesia and sleep. *Can J. Physiol Pharmacol* 1991;69:678-82.

68. Lecci A, Giuliani S, Patacchini R, Viti G, Maggi CA. Role of NK1 tachykinin receptor in thermnociception: effect of CP96,345, a non-peptide substance P antagonist, on the hot plate test in mice. *Neurosci Lett* 1991;129:299-02.
69. Leigh TJ, Bird HA, Hindmarch I, Wright V. A comparison of sleep in rheumatic and non-rheumatic patients. *Clin. Exp. Rheumatol* 1987;5:363-5.
70. Lentz MJ, Landis CA, Rothermel J, Shaver JL. Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women. *J Rheumatol* 1999;26:1586-92.
71. Lieb K, Ahlvers K, Dancker K, Strohmusch S, Reincke M, Feige B, Berger M, Riemann D, Voderholzer U. Effects of the neuropeptide substance P on sleep, mood, and neuroendocrine measures in healthy young men. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27:1041-49.
72. Lombard MC, Jarlet MA, Daheb S. Correlation between deafferentation, self-mutilation, neuronal rhythmic activity and sleep disturbance in the rat. *Pain* 1984; S-2.
73. Ma QP, Woolf CJ. Involvement of neurokinin receptors in the induction but not the maintenance of mechanical allodynia in rat flexor motoneurons. *J Physiol* 1995; 486:769-77.
74. Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by modified multiple platform technique: Quantification of sleep loss and recovery. *Brain Res* 2004;1004:45-51.
75. Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* 1993;13:23-93.

76. Manning BH. A lateralized deficit in morphine antinociception after unilateral inactivation of the central amygdala. *J Neurosci* 1998;18:9453-70.
77. Martin G, Montagne-Clavel J, Oliveras JL. Involvement of ventromedial medulla "multimodal, multireceptive" neurons in opiate spinal descending control system: a single-unit study of the effect of morphine in the awake, freely moving rat. *J Neurosci* 1992;12:1511-22.
78. Mason P. Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:737-77.
79. May ME, Harvey MT, Valdovinos MG, Kline RH 4th, Wiley RG, Kennedy CH. Nociceptor and age specific effects of REM sleep deprivation induced hyperalgesia. *Behav Brain Res* 2005;159:89-94.
80. McLeod AL, Ritchie J, Cuello AC, Julien JP, Ribeiro-Da-Silva A, Henry JL. Transgenic mice over-expressing substance P exhibit allodynia and hyperalgesia which are reversed by substance P and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuroscience* 1999;89:891-9.
81. Miller NE, Bartus RT. Sleep, sleep pathology, and psychopathology in later life: a new research Frontier. *Neurobiol Aging* 1982;3:283-6.
82. Moldofsky H, LUE FA, Smythe HA. Alpha EEG sleep and morning symptoms in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol* 1983;10: 373-9.
83. Moldofsky H, Scarisbrick P, England R, Smythe H. Musculoskeletal symptoms and non-REM sleep disturbance in patients with "fibrositis syndrome" and healthy subjects. *Psychosom Med* 1975;37:341-51.

84. Moldofsky H, Scarisbrick P. Induction of neurasthenic musculoskeletal pain syndrome by selective sleep stage deprivation. *Psychosom Med* 1976;38:35-44.
85. Moldofsky H. Sleep and fibrositis syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1989;15:91-103
86. Moldofsky H. Sleep and Pain. *Sleep Med* 2001; 5:387-98.
87. Morden B, Mitchell G, Dement W. Selective REM sleep deprivation and compensation phenomena in the rat. *Brain Res* 1967;5:339-49.
88. Morin CM, Gibson D, Wade J. Self-reported sleep and mood disturbance in chronic pain patients. *Clin J Pain* 1998;14:311-4.
89. Murtra P, Sheasby AM, Hunt SP, De Felipe C. Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 2000;405:180-3.
90. Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14:123-36.
91. Ohayon MM. Relationship between chronic painful physical condition and insomnia. *J Psychiatr Res* 2005;39:151-9.
92. Older SA, Battafarano DF, Danning CL, Ward JA, Grady EP, Derman S, Russell IJ. The effects of delta wave sleep interruption on pain thresholds and fibromyalgia-like symptoms in healthy subjects; correlations with insulin-like growth factor I. *J Rheumatol* 1998;25:1180-6.

93. Onen SH, Alloui A, Eschalier A, Dubray C. Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat. *Neurosci Lett* 2000;291:25-8.
94. Onen SH, Alloui A, Gross A, Eschalier A, Dubray C. The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *J Sleep Res* 2001a;10:35-42.
95. Onen SH, Alloui A, Jourdan D, Eschalier A, Dubray C. Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Res* 2001b;900:261-7.
96. Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 1993;73:229-308.
97. Paiva T, Farinha A, Martins A, Batista A, Guilleminault C. Chronic headaches and sleep disorders. *Arch Intern Med* 1997;157:1701-5.
98. Partinen M. Sleep disorder related to Parkinson's disease. *J Neurol* 1997; 244:S3-S6.
99. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic, New York, 1986.
100. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev* 1983;35:85-141.
101. Prinz PN. Sleep and sleep disorders in older adults. *Journal Clin Neurophysiol* 1995;12:139-46.
102. Przewlocka B, Mogilnicka E, Lason W, van Luijtelaar EL, Coenen AM. Deprivation of REM sleep in the rat and the opioid peptides beta-endorphin and dynorphin. *Neurosci Letter* 1986;70:138-42.

103. Przewlocki R. Some aspects of physiology and pharmacology of endogenous opioid peptides. *Pol J Pharmacol Pharm* 1984;36:137-58
104. Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orléans-Juste P. Receptors for substance P and related neurokinins. *Pharmacology* 1989;38:1-15.
105. Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 1969;164:444-5
106. Ripley TL, Gadd CA, De Felipe C, Hunt SP, Stephens DN. Lack of self-administration and behavioural sensitisation to morphine, but not cocaine, in mice lacking NK1 receptors. *Neuropharmacology* 2002;43:1258-68.
107. Roehrs T, Hyde M, Blaisdell B, Greenwald M, Roth T. Sleep loss and REM sleep loss are hyperalgesic. *Sleep* 2006;29:145-51
108. Rupniak NMJ. Use of substance P receptor antagonists as research tools in psychopharmacology. *Neurotransmissions* 1993;15:3-11.
109. Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, Lopez Y, MacKillip F. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum* 1994;37:1593-601.
110. Saffroy M, torrens Y, Glowinski J, Beaujouan J-C. Autoradiographic distribution of tachykinin NK2 binding sites in the rat brain: comparison with NK1 and Nk3 binding sites. *Neuroscience* 2003;116:761-73.
111. Schutz TC, Andersen ML, Tufik S. Influence of temporomandibular joint pain on sleep patterns: role of nitric oxide. *J Dent Res* 2004;83:693-7.
112. Schutz TC, Andersen ML, Tufik S. Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats. *Brain Res.* 2003;993:164-71.

113. Schutz TC, Andersen ML, Tufik S. Effects of COX-2 inhibitor in acute inflammation of the temporomandibular joints of rats. *J Dental Res* 2006. No prelo.
114. Seguin L, Marouilli-Girardon S, Millan, MJ. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin1 and neurokinin2 receptor antagonists: a comparison to other classes of antinociceptive agent. *Pain* 1995;61:325-43.
115. Shapiro C, Girdwood P. Protein synthesis in rat brain during sleep. *Neuropharmacology* 1981;20:457-60.
116. Silva AB, Bertorini TE, Lemmi H. Polisomnography in idiopathic muscle pain syndrome (fibrositis). *Arq. Neuropsiquiatr* 1991;49: 437-41.
117. Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Abilio VC, Tufik S, Frussa-Filho R. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2004;82:90-8.
118. Smith MT, Edwards RR, Stonerock GL, McCann UD. Individual variation in rapid eye movement sleep is associated with pain perception in healthy women: preliminary data. *Sleep* 2005;28:809-12.
119. Smith MT, Haythornthwaite JA. How do sleep disturbance and chronic pain inter-relate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. *Sleep Med Rev* 2004;8:119-32.
120. Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in

- endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1544-9.
121. Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 1999;354:1435-9.
122. Sprenger T, Valet M, Boecker H, Henriksen G, Spilker ME, Willoch F, Wagner KJ, Wester HJ, Tolle TR. Opioidergic activation in the medial pain system after heat pain. *Pain* 2006;122:63-7.
123. Stoessl Aj, Hill DR. Autoradiographic visualization of NK-3 tachykinin binding sites rat brain, utilizing [3H]senktide. *Brain Res* 1990; 534:1-7.
124. Suchecki, D.; Tufik, S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiol Behav* 2000. 68: 309-316.
125. Tsigos C, Diemel LT, White A, Tomlinson DR, Young RJ. Cerebrospinal fluid levels of substance P and calcitonin-gene-related peptide: correlation with sural nerve levels and neuropathic signs in sensory diabetic polyneuropathy. *Clin Sci (Colch)* 1993;84:305-11.
126. Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 1978;16:98-105.
127. Ugalde E, Corsi-Cabrera M, Juarez J, Ramos J, Arce C. Waking eletroencephalogram activity as a consequence of sleep and total sleep deprivation in the rat. *Sleep* 1994;17:226-30.

128. Ukponmwan OE, Rupreht J & Dzoljic MR. Paradoxal sleep deprivation decrease the antinociceptive property of enkephalinase-inhibition, morphine and cold-water-swim. *Gen Pharmacol* 1984;15:255-58.
129. Ukponmwan OE, Rupreht J, Dzoljic M. An analgesic effect of enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986a;332:376-9.
130. Ukponmwan OE, v d Poel-Heisterkamp AL, Dzoljic MR. REM sleep deprivation antagonizes morphine-induced akinesia and catalepsy. *Sleep* 1986b;9:415-22.
131. Vaccarino AL, Olson GA, Olson RD, Kastin AJ. Endogenous opiates: 1998. *Peptides* 1999;20:1527-74.
132. Vaeroy H, Helle R, Terenis L. Elevated CSF levels of substance P. and high incidence of Raynaud's phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis. *Pain* 1988; 32:21-6.
133. Vermeirsch H, Meert TF. Morphine-induced analgesia in the hot-plate test: comparison between NMRI(nu/nu) and NMRI mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;94:59-64.
134. Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:2-31.
135. Wilson KG, Watson ST, Currie SR. Daily diary and ambulatory activity monitoring of sleep in patients with chronic musculoskeletal pain. *Pain* 1998;75:75-84.

136. Winters WD, Hance AJ, Cadd GG, Quam DD, Benthuisen JL. Ketamine- and morphine-induced analgesia and catalepsy. I. Tolerance, cross-tolerance, potentiation, residual morphine levels and naloxone action in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:51-7.
137. Xu XJ, Dalsgaard CJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Intrathecal CP-96,345 block reflex facilitation induced in rats by substance P and C-fiber-conditioning stimulation. *Eur J Pharmacol* 1992;216:337-44.
138. Yang SW, Zhang ZH, Wang R, Xie YF, Qiao JT, Dafny N. Norepinephrine and serotonin-induced antinociception are blocked by naloxone with different dosages. *Brain Res Bull* 1994;35:113-7.
139. Yashpal K, Pitcher GM, Henry JL. Noxious peripheral stimulation produces antinociception mediated via substance P and opioid mechanisms in the rat tail-flick test. *Brain Res* 1995;674:97-103.
140. Young RF, Kroening R, Fulton W, Feldman RA, Chambi I. Electrical stimulation of the brain in treatment of chronic pain. Experience over 5 years. *J Neurosurg* 1985;62:389-96.
141. Zaratin P, Angelici O, Clarke GD, Schmid G, Raiteri M, Carita F, Bonanno G. NK3 receptor blockade prevents hyperalgesia and the associated spinal cord substance P release in monoarthritic rats. *Neuropharmacology* 2000;39:141-9.
142. Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS. Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science* 2001;293:311-5.

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain μ -opioid receptors

Article Type: Research Reports

Corresponding Author: Mrs Monica L Andersen, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Sao Paulo-UNIFESP

First Author: Danielle C Nascimento

Order of Authors: Danielle C Nascimento; Monica L Andersen, PhD; Debora C Hipolide, PhD; Jose J Nobrega, PhD; Sergio Tufik, PhD

Abstract: Previous studies have established a relationship between sleep disruption and pain, and it has been suggested that hyperalgesia induced by paradoxical sleep deprivation (PSD) could be due to a reduction of opioidergic neurotransmission in the brain. In the present study rats deprived of sleep for 96 hr as well as rats allowed to recover for 24 hr after PSD and normal controls received vehicle or morphine (2.5, 5 and 10 mg/kg, i.p.) and were tested on a hotplate 1 hr later. Quantitative receptor autoradiography was used to map alterations in binding to brain μ -opioid receptors in separate groups. Results demonstrated that PSD induced a significant reduction in thermal pain threshold, as measured by paw withdrawal latencies. This effect did not return to baseline control values after 24 hours of sleep recovery. The usual analgesic effect of morphine was observed in the control group but not in PSD or rebound groups except at the highest dose (10 mg/kg). Binding of [3H]DAMGO to μ sites did not differ significantly among the three groups in any of the 33 brain regions examined. These results do not exclude the participation of the opioid system in PSD-induced pain hypersensitivity since sleep-deprived rats were clearly resistant to morphine. However, the fact no changes were seen in [3H]DAMGO binding indicates that mechanisms other than altered μ -opioid binding must be sought to explain the phenomenon.

DEPARTMENT OF PSYCHOBIOLOGY - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Rua Napoleão de Barros, 925 - São Paulo, SP - 04024-002, Brazil. Phone #: (55-11) 5539-0155; Fax #: (55-11) 5572-5092

August 14, 2006

Dear Editor:

Enclosed is the manuscript by Danielle C. Nascimento and colleagues, titled "*Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain μ -opioid receptors*" for possible publication in *Behavioural Brain Research*.

This article is part of our line of research that investigates the effects of sleep deprivation on nociceptive mechanisms. Recently, we have described the involvement of Substance P in sleep-wake mechanisms without activation of painful responses in mice (Beh Brain Research, 2006). In this present study, we addressed the hypothesis by testing behavioral responses to morphine and examining μ -opioid receptor binding in brains of sleep-deprived and sleep-recovered rats.

This manuscript contains original data and is not being considered elsewhere for publication. All authors have read and approved the manuscript. The experimental protocol used in the present study complied with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the UNIFESP Ethical Committee. All correspondence should be sent to me at the address at the address on the above letter-head.

Thank you for your attention.

Sincerely,

Monica Andersen

Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain μ -opioid receptors

Danielle C. Nascimento^a; Monica L. Andersen^a; Débora Cristina Hipólide^a; José
N. Nobrega^b; Sergio Tufik^a

^aDepartment of Psychobiology – Universidade Federal de São Paulo, Escola
Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), R. Napoleão de Barros, 925, V.
Clementino 04024-002, São Paulo, SP, Brazil

^bNeuroimaging Research Section, Centre for Addiction and Mental Health, 250
College St., Toronto, Ont., Canada

Running title: Pain, sleep deprivation, μ -opioid receptor

Text Pages: 24

Figure: 1

Table: 1

Corresponding author:

Monica Levy Andersen

Department of Psychobiology - Universidade Federal de São Paulo

Rua Napoleão de Barros, 925.

Vila Clementino – SP

04024-002

São Paulo - Brazil

Phone # (55-11) 2149-0155

Fax # (55-11) 5572-5092

E-mail address: mandersen@psicobio.epm.br

Abstract

Previous studies have established a relationship between sleep disruption and pain, and it has been suggested that hyperalgesia induced by paradoxical sleep deprivation (PSD) could be due to a reduction of opioidergic neurotransmission in the brain. In the present study rats deprived of sleep for 96 hr as well as rats allowed to recover for 24 hr after PSD and normal controls received vehicle or morphine (2.5, 5 and 10 mg/kg, i.p.) and were tested on a hotplate 1 hr later. Quantitative receptor autoradiography was used to map alterations in binding to brain μ -opioid receptors in separate groups. Results demonstrated that PSD induced a significant reduction in thermal pain threshold, as measured by paw withdrawal latencies. This effect did not return to baseline control values after 24 hours of sleep recovery. The usual analgesic effect of morphine was observed in the control group but not in PSD or rebound groups except at the highest dose (10 mg/kg). Binding of [3 H]DAMGO to μ sites did not differ significantly among the three groups in any of the 33 brain regions examined. These results do not exclude the participation of the opioid system in PSD-induced pain hypersensitivity since sleep-deprived rats were clearly resistant to morphine. However, the fact no changes were seen in [3 H]DAMGO binding indicates that mechanisms other than altered μ -opioid binding must be sought to explain the phenomenon.

Keywords: pain, paradoxical sleep deprivation, sleep rebound, μ -opioid receptors, thermal nociception, rats.

Introduction

Acute and chronic pain are closely associated with sleep disturbances. Pain has been reported to be an important cause of sleeplessness [33] and, conversely, interrupted sleep has often been associated with increased pain [22,23,25,29,30,32,33,34,38]. Sleep is a dynamic form of homeostasis restoration and it is reasonable to assume that sleep disruption or abolishment may lead to behavioral alterations such as increased sensitivity to pain.

Hicks et al [14] first demonstrated a decrease in pain threshold in rats after paradoxical sleep deprivation (PSD) and several subsequent studies further documented the phenomenon [32,33,34,45,46]. There are, however, a few discordant reports in the literature concerning both the basic phenomenon of PSD-induced hyperalgesia [e.g. 3,8] as well as the persistence of deprivation-related changes in pain sensitivity after sleep recovery [32]. The issue therefore would seem to warrant further investigation.

A recent in-depth review by Lautenbacher et al [24] highlighted the fact that basic mechanisms governing sleep-induced alterations in pain sensitivity are still unknown, and the difficulty in defining the mechanism by which PSD affects pain thresholds suggests a fairly complex chain of events. Among these, sleep-deprived animals might have alterations in the opioidergic receptor system, as hypothesized by Hicks et al [14,15]. The opioidergic system is part of a central pathway for processing nociception, and painful stimuli promote changes in opioid binding in specific brain areas involved in pain processing [4,43,51]. Studies with μ -opioid receptor knockout mice have revealed shorter latencies in response to thermal pain in these animals and have demonstrated

the importance of μ -opioid receptors in morphine analgesia at both spinal and supraspinal levels [41]. These findings have led to the inference that reductions in, or absence of μ -opioid receptors may produce hyperalgesia and have strengthened the notion of a role for central μ -opioid receptors in pain management.

King et al [20] showed that both beta-endorphin and morphine produce insomnia, inhibiting slow wave sleep (SWS) and totally suppressing paradoxical sleep. Pretreatment with naloxone reversed SWS inhibition, but did not antagonize the paradoxical sleep suppressant effect. In PSD subjects increased concentrations of beta-endorphin have been found in plasma, while a small decrease has been found in the hypothalamus [36]. In experimental animals opioid receptor binding has been reported to be significantly decreased in the limbic system after PSD [12].

Further studies demonstrated that PSD also reduces morphine antinociception and that enkephalinase inhibition reduces the high seizure susceptibility seen in PSD animals [45,46]. Thus, it seems plausible that animals deprived of paradoxical sleep might have less opioid receptor responsiveness [32,34]. Conceivably, PSD-induced alterations in opioid secretion might provoke compensatory regulation of opioid receptors leading to altered responses to morphine administration. In the present study we addressed this hypothesis by testing behavioral responses to morphine and examining μ -opioid receptor binding in brains of sleep-deprived and sleep-recovered rats.

Materials and Methods

Subjects

Adult male Wistar rats 90 days old (300-400g) from our colony were used in the present study. The experiments were approved by the Ethical Research Committee of Universidade Federal de São Paulo (CEP N° 1043/05) and followed International Guidelines for the Care of Research Animals.

Paradoxical sleep deprivation procedure (PSD)

Naive rats were randomly assigned to home-cage control (CTRL) (n=8), PSD (n=8) and rebound groups (REB) (n=8). The animals were submitted to PSD for a period of 96h using the modified multiple platform method. To attain PSD, 14 narrow circular platforms (6.5 cm in diameter) were placed inside a tiled tank (123 x 44 x 44 cm) filled with water to within 1 cm of the platforms' surface. This arrangement allowed rats to move about by leaping from one platform to another. Separate tanks were used for each group. In this procedure, when an animal reaches the paradoxical phase of sleep, the accompanying muscle atonia causes it to touch the water and wake up. The rebound group was submitted to 96h of PSD and then allowed 24h of undisturbed sleep. Under our conditions, this procedure causes a complete loss of paradoxical sleep (100%) in each of the 4 days and also reduces SWS by approximately 30% [26].

Throughout the study, the experimental room was maintained at a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a 12 hr light-dark cycle (lights on at 07:00 a.m.). Food and water were provided *ad libitum* by placing pellets and water bottles on

a grid located on top of the tank. Water in the tanks was changed daily throughout the PSD period. CTRL and REB groups were maintained in the same room as the experimental PSD rats.

The entire sleep deprivation procedure was repeated on 8 separated occasions to provide independent groups of 8 rats for each of the drug doses tested, as described below.

Drug administration

After 96h of PSD or an equivalent time for CTRL and REB groups, animals in each group were injected intraperitoneally with vehicle (saline) or morphine at three different doses (2.5, 5 and 10 mg/kg) and subjected to the paw withdrawal test one hour later. Rats in the PSD group were kept in the tank during the 1 hr interval between injections and the hot plate test.

Hot-plate test

For evaluation of pain sensitivity, individual rats were placed on a hot plate (Ugo Basile, Biological Research Apparatus Company, Comerio, Italy) maintained at $50 \pm 1^\circ\text{C}$ [5], following the procedure described by Eddy and Leimbach [9]. Latency to lift either a hindpaw or a forepaw or to jump off to avoid thermal pain was measured, at which point the animal was immediately removed from the hot plate. A latency period of 90 seconds was defined as complete analgesia and used as cut-off time for rats that did not respond. Tests were always conducted between 08:00 a.m. and 10:00 a.m.

Autoradiography procedure

The [^3H]D-Ala², N-mePhe⁴, Gly-o15-enkephalin (DAMGO) binding assay followed the procedures described by Fadda et al [12] with minor modifications. Fresh groups of PSD, REB and CTRL rats (n=10 per group) were used for the binding assay. Rats were killed by decapitation and brains were rapidly removed, frozen over dry ice and stored at -80°C until processed for autoradiography. Twenty-micron coronal sections were cut at -20°C in a Leica cryostat from the olfactory bulbs to the caudal medulla. Sections were thaw-mounted onto lysine-coated slides and then stored at -80°C. Each slide included six sections.

For the assay, slide-mounted sections were allowed to equilibrate to room temperature, then preincubated in 100 mM Tris-HCl buffer pH=7.4 for 40 min at 0-4°C to remove endogenous ligands and subsequently incubated for 40 min at room temperature in buffer containing 3nM [^3H]DAMGO (50Ci/mmol - PerkingElmer) in the presence (for specific binding) or absence (for total and non-specific binding) of 1mM unlabeled naloxone. The sections were rinsed twice for 3 minutes in ice-cold buffer, dipped for 10 seconds in ice-cold distilled water, air-dried and then exposed for 8 weeks to Kodak Biomax film along with calibrated radioactive standards. Films were developed in Kodak D-19 according to the manufacturer's instructions.

Densitometric analyses were performed using an M2 MCID system (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canada) on coded films. Brain regions were defined according to the atlas of Paxinos and Watson [35] and

samples were examined without previous knowledge of which group they originated from.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E. Differences between groups in the behavioral experiment were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA). Binding data were analyzed by one-way ANOVA for each brain region. Both were followed by Duncan tests for a posteriori comparison of means. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Paw withdrawal latencies

A two-way ANOVA revealed a significant group effect [$F_{(2,21)} = 33.205$; $p < 0.05$], a significant drug effect [$F_{(3,63)} = 15.006$; $p < 0.05$], and a significant interaction between these factors [$F_{(6,63)} = 3.018$; $p < 0.05$]. As shown in Figure 1, in groups not receiving morphine PSD induced a decrease of 40.75% in the threshold of paw withdraw ($p < 0.05$). In the sleep rebound group pain threshold was still decreased by 43.91% compared to controls ($p < 0.05$), indicating that 24 hr of sleep recovery was not sufficient to restore pain sensitivity to control levels.

As expected, in non-deprived rats morphine had clear analgesic effects at all doses used, as indicated by the higher values of CTRL groups compared to saline (Figure 1, empty bars, $p < 0.05$). In these groups the average increase in paw withdraw latency was approximately 40% relative to animals receiving.

In sleep-deprived and sleep-recovered rats the antinociceptive effect of morphine was significantly reduced at doses of 2.5 mg/kg ($p < 0.05$) and 5 mg/kg ($p = 0.05$). After 10 mg/kg morphine latencies in PSD and REB groups were not significantly different from latencies in the respective CTRL group ($p > 0.05$) and were significantly higher than latencies in the PSD and REB groups tested with lower doses of morphine (Figure 1).

[³H]DAMGO autoradiography

Binding to μ -opioid receptors did not differ significantly among PSD, REB and CTRL groups in any of 33 brain regions analyzed (Table 1).

Discussion

The present findings indicate that the threshold of paw withdraw after thermal noxious stimulation was reduced after 96h of PSD and that this effect persisted after 24 h of sleep recovery. Moreover, PSD reduced the antinociceptive property of morphine in the hot plate test at doses of 2.5 and 5 mg/kg, but not at the highest dose of 10 mg/kg. A further intent of this study was to examine the possibility that this enhancement in pain sensitivity might involve regional brain alterations in binding to μ -opioid receptors. Autoradiographic mapping of [³H]DAMGO binding revealed that μ -opioid receptor binding was unaltered after PSD or during subsequent sleep rebound.

Sleep deprivation has been considered as a health risk factor that contributes to several disease processes [28], reduces longevity [21] and leads

to behavioral [40,44], hormonal [1,2,42] and neurochemical [7,13,16,17] alterations, as well as changes in pain sensitivity [24].

Our results agree with those of Onen et al [34] regarding altered thermal pain perception after PSD, but not with a previous study [32] where it was reported that 24 hr sleep recovery restored pain sensitivity (assessed by vocalization threshold after noxious paw pressure) to baseline levels. Our hyperalgesia findings also contrast with two other studies. Asakura et al [3] failed to observe reduced latency in nociceptive responses after 48h of PSD in mice, and Dametto et al [8] actually reported an increase in shock-induced vocalization and flinching threshold after PSD in rats. It is quite possible that these discrepancies relate to factors such as duration of sleep deprivation and differences in pain modalities induced by different types of noxious stimulation.

Our results are in good agreement with the earlier findings of Ukponmwan and co-workers [45,46] which showed a reduction in the analgesic effect of morphine in PSD animals. In that investigation, they reported that the analgesic effects of phosphoramidon (an enkephalinase inhibitor) and of morphine were abolished over 96h of PSD.

The fact that in the present study the highest dose of morphine was effective in reversing the hyperalgesia induced by PSD might suggest that high doses of opioids could be beneficial in the management of pain in conditions involving sleep disruption. We should note, however, that the highest dose of morphine (10 mg/kg) induced akinesia and catalepsy in several animals, and it is likely that the observed increase in paw withdraw latency in this group reflects impaired motoric function [49] rather than true analgesia. Also to be

emphasized in this context is the fact that long-term morphine treatment can itself decrease paradoxical sleep time and induce long-lasting hyperalgesia in rats [6]. Taken together, these results caution against the use of morphine for sleep-related chronic pain.

Morphine produces analgesia both directly by activating opioid receptors (mainly of the μ subtype) and indirectly by influencing the release of opioid peptides [41]. Moreover PSD seems to promote an inhibition of opioid protein synthesis [39] and has been reported to modify the binding of μ -opioid receptors in limbic brain areas [12]. In the present study no changes were found in [3 H]DAMGO binding in an autoradiographic analysis that included a number of brain areas that have been implicated in pain control. Thus it seems unlikely that reduction of morphine analgesia after PSD is due to μ -opioid receptor down-regulation, although the possibility remains that changes may occur at other levels of the opioid system.

Other data indicate that ventromedial medullary 5-HT₂ and 5-HT₃ serotonergic receptors modulate transmission of opioid pain-inhibitory signals from the periaqueductal gray [19]. Indeed, opioidergic and serotonergic pathways are closely interconnected and can interact to modulate several behavioral functions including nociception [50]. Moreover, there is evidence that knockout mice lacking substance P neurokinin-1 receptors are insensitive to opiates [32,37]. This leads to the suggestion that other neurotransmitter systems may be involved and should be better explored in the context of PSD-induced changes in responses to morphine.

In this study, it was elected to use thermal stimuli to evaluate pain thresholds. This method has been often used to evaluate nociceptive threshold in rats, at the supraspinal level, by quantifying latency to lick a hindpaw [10,11,18,27,48]. May and colleagues [27] demonstrated that 48 hr of PSD promotes alterations in paw withdrawal latencies only when hot-plate temperature was set to about 44°C and that the effect occurred possibly through nociceptor C fiber activation. Although we used 50°C, our latency data are very similar in magnitude to the results of May et al [27] with 44°C. C fiber nociceptor-mediated responses typically require more sustained stimulation, which promotes high basal latencies for paw withdrawal. Also, C fiber nociceptor-mediated response is more sensitive to μ -opioid stimulation, whereas stronger activation of A delta fiber nociceptor is compatible with higher temperatures, promoting fast reflex responses and shorter pain latencies. It is worth mentioning that the nociception produced by activation of A delta fiber nociceptors is resistant to opiates [27].

It is interesting to note that 24h rebound was not sufficient to return the hotplate latencies to control baseline values. Machado and colleagues [26] showed that while the PSD procedure used here leads to a 100% suppression of paradoxical sleep and a 31% reduction in SWS, 24 hr of undisturbed sleep is enough for a complete recovery of both types of sleep. The fact that pain sensitivity remained altered after the complete restoration of sleep suggests the possibility of long-lasting effects of PSD on pain sensitivity. Future studies should attempt to establish the time course of PSD-induced hyperalgesic effects.

In summary, we have confirmed the occurrence of hyperalgesia after PSD and a reduced analgesic effect of morphine after PSD, which persists for at least 24 hr after sleep recovery. While the exact mechanisms responsible for the relationship between sleep disruption and pain remain unclear, our data indicate that alterations in μ -opioid binding do not play a role in this process. Given the diminished responsivity to morphine in PSD rats, these results do not rule out alterations in the opioid system at levels other than membrane binding. Modulatory effects of other neurotransmitters on opioidergic transmission also remain a viable possibility.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Associação Fundo de Incentivo a Psicofarmacologia (AFIP) and FAPESP/CEPID (01/14303-0 to S. T). We are grateful to Karin M. Moreira and Diva Maria Lima for their assistance in the autoradiography procedures and to Marilde A. Costa, Alice A. Santos and Tomé Pimentel for their diligence in the execution of the behavioral experiments.

References

- [1] Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 2005;14:83-90.
- [2] Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res Rev* 2006;51:136-43.
- [3] Asakura W, Matsumoto K, Ohta H, Watanabe H. REM sleep deprivation decreases apomorphine-induced stimulation of locomotor activity but not stereotyped behavior in mice. *Gen Pharmacol* 1992;23:337-41.
- [4] Bencherif B, Fuchs PN, Sheth R, Dannals RF, Campbell JN, Frost JJ. Pain activation of human supraspinal opioid pathways as demonstrated by [11C] carfentanil and positron emission tomography (PET). *Pain* 2002;99:589-98.
- [5] Bolles RC, Fanselow MS. Endorphins and behavior. *Annu Rev Psychol*. 1982;33:87-101.
- [6] Celerier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. *J Neurosci* 2001;21:4074-80.
- [7] D'Almeida V, Lobo LL, Hipolide DC, de Oliveira AC, Nobrega JN, Tufik S. Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. *Neuroreport* 1998;9:2853-6.
- [8] Dametto M, Suchecki D, Bueno OF, Moreira KM, Tufik S, Oliveira MG. Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behav Brain Res* 2002;129:171-8.

- [9] Eddy NB, Leim Bach D. Synthetic analgesics III. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmac Exp Therap* 1953;107:385-93.
- [10] Espejo EF, Stinus L, Cador M, Mir D. Effects of morphine and naloxone on behaviour in the hot plate test: an ethopharmacological study in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;113:500-10.
- [11] Espejo EF, Mir D. Differential effects of weekly and daily exposure to the hot plate on the rat's behavior. *Physiol Behav* 1994;55:1157-62 .
- [12] Fadda P, Tortorella A, Fratta W. Sleep deprivation decreases mu and delta opioid receptor binding in the rat limbic system. *Neurosci Letter* 1991;129:315-7.
- [13] Farooqui SM, Brock JW, Zhou J. Changes in monoamines and their metabolite concentrations in REM sleep-deprived rat forebrain nuclei. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:385-91.
- [14] Hicks RA, Moore JD, Findley P, Hirshfield C, Humphrey V. REM sleep deprivation and pain thresholds in rats. *Percept Mot Skills* 1978;47:848-50.
- [15] Hicks RA, Coleman DD, Ferrante F, Sahatjian M, Hawkins J. Pain thresholds in rats during recovery from REM sleep deprivation. *Percept Mot Skills* 1979;48:687-90.
- [16] Hipolide DC, Moreira KM, Barlow KB, Wilson AA, Nobrega JN, Tufik S. Distinct effects of sleep deprivation on binding to norepinephrine and serotonin transporters in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:297-303.

- [17] Hipolide DC, Suchecki D, Pimentel de Carvalho Pinto A, Chiconelli Faria E, Tufik S, Luz J. Paradoxical sleep deprivation and sleep recovery: effects on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, energy balance and body composition of rats. *J Neuroendocrinol* 2006;18:231-8.
- [18] Johnston IN, Westbrook RF. Acute and conditioned sickness reduces morphine analgesia. *Behav Brain Res* 2003;142:89-97.
- [19] Kiefel JM, Cooper ML, Bodnar RJ. Serotonin receptor subtype antagonists in the medial ventral medulla inhibit mesencephalic opiate analgesia. *Brain Res* 1992;597:331-8.
- [20] King C, Masserano JM, Codd E, Byrne WL. Effects of beta-endorphin and morphine on the sleep-wakefulness behavior of cats. *Sleep* 1981;4:259-62.
- [21] Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC. Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Arch Gen Psychiatry*. 1979;36:103-16.
- [22] Kundermann B, Krieg JC, Schreiber W, Lautenbacher S. The effect of sleep deprivation on pain. *Pain Res Manag* 2004a;9:25-32.
- [23] Kundermann B, Sernal J, Huber MT, Krieg JC, Lautenbacher S. Sleep deprivation affects thermal pain thresholds but not somatosensory thresholds in healthy volunteers. *Psychosom Med* 2004b;66:932-7.
- [24] Lautenbacher S, Kundermann B, Krieg JC. Sleep deprivation and pain perception. *Sleep Med Rev* 2005. In press.

- [25] Lentz MJ, Landis CA, Rothermel J, Shaver JL. Effects of selective slow wave sleep disruption on musculoskeletal pain and fatigue in middle aged women. *J Rheumatol* 1999;26:1586-92.
- [26] Machado RB, Hipolide DC, Benedito-Silva AA, Tufik S. Sleep deprivation induced by modified multiple platform technique: Quantification of sleep loss and recovery. *Brain res* 2004;1004:45-51.
- [27] May ME, Harvey MT, Valdovinos MG, Kline RH 4th, Wiley RG, Kennedy CH. Nociceptor and age specific effects of REM sleep deprivation induced hyperalgesia. *Behav Brain Res* 2005;159:89-94.
- [28] Miller NE, Bartus RT. Sleep, sleep pathology, and psychopathology in later life: a new research Frontier. *Neurobiol Aging* 1982;3:283-6.
- [29] Moldofsky H, Scarisbrick P, England R, Smythe H. Musculoskeletal symptoms and non-REM sleep disturbance in patients with "fibrositis syndrome" and healthy subjects. *Psychosom Med* 1975;37:341-51.
- [30] Moldofsky H, Scarisbrick P. Induction of neurasthenic musculoskeletal pain syndrome by selective sleep stage deprivation. *Psychosom Med* 1976;38:35-44.
- [31] Murtra P, Sheasby AM, Hunt SP, De Felipe C. Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 2000;405:180-3.
- [32] Onen SH, Alboui A, Eschalier A, Dubray C. Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat. *Neurosci Letter* 2000;291:25-8.

- [33] Onen SH, Alloui A, Gross A, Eschallier A, Dubray C. The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *J Sleep Res* 2001a;10:35-42.
- [34] Onen SH, Alloui A, Jourdan D, Eschallier A, Dubray C. Effects of rapid eye movement (REM) sleep deprivation on pain sensitivity in the rat. *Brain Res* 2001b;900:261-7.
- [35] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic, New York, 1986.
- [36] Przewlocka B, Mogilnicka E, Lason W, van Luijtelaar EL, Coenen AM. Deprivation of REM sleep in the rat and the opioid peptides beta-endorphin and dynorphin. *Neurosci Letter* 1986;70:138-42.
- [37] Ripley TL, Gadd CA, De Felipe C, Hunt SP, Stephens DN. Lack of self-administration and behavioural sensitisation to morphine, but not cocaine, in mice lacking NK1 receptors. *Neuropharmacology* 2002;43:1258-68.
- [38] Roehrs T, Hyde M, Blaisdell B, Greenwald M, Roth T. Sleep loss and REM sleep loss are hyperalgesic. *Sleep* 2006;29:145-51.
- [39] Shapiro C, Girdwood P. Protein synthesis in rat brain during sleep. *Neuropharmacology* 1981;20:457-60.
- [40] Silva RH, Chehin AB, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Abilio VC, Tufik S, Frussa-Filho R. Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2004;82:90-8.

- [41] Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1544-9.
- [42] Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet* 1999;354:1435-9.
- [43] Sprenger T, Valet M, Boecker H, Henriksen G, Spilker ME, Willoch F, Wagner KJ, Wester HJ, Tolle TR. Opioidergic activation in the medial pain system after heat pain. *Pain* 2006;122:63-7.
- [44] Tufik S, Lindsey CJ, Carlini EA. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? *Pharmacology* 1978;16:98-105.
- [45] Ukponmwan OE, Rupreht J, Dzoljic MR. REM sleep deprivation decreases the antinociceptive property of enkephalinase-inhibition, morphine and cold-water swim. *Gen Pharmacol* 1984;15:255-8.
- [46] Ukponmwan OE, Rupreht J, Dzoljic M. An analgesic effect of enkephalinase inhibition is modulated by monoamine oxidase-B and REM sleep deprivations. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986a;332:376-9.
- [47] Ukponmwan OE, v d Poel-Heisterkamp AL, Dzoljic MR. REM sleep deprivation antagonizes morphine-induced akinesia and catalepsy. *Sleep* 1986b;9:415-22.

- [48] Vermeirsch H, Meert TF. Morphine-induced analgesia in the hot-plate test: comparison between NMRI(nu/nu) and NMRI mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;94:59-64.
- [49] Winters WD, Hance AJ, Cadd GG, Quam DD, Benthuyssen JL. Ketamine- and morphine-induced analgesia and catalepsy. I. Tolerance, cross-tolerance, potentiation, residual morphine levels and naloxone action in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;244:51-7.
- [50] Yang SW, Zhang ZH, Wang R, Xie YF, Qiao JT, Dafny N. Norepinephrine and serotonin-induced antinociception are blocked by naloxone with different dosages. *Brain Res Bull* 1994;35:113-7.
- [51] Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS. Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science* 2001;293:311-5.

Legend

Fig. 1 - Inhibitory effect of PSD on morphine analgesia at three different doses.

Values are expressed as means \pm S.E. N= 8 per group. * Values significantly different from corresponding CTRL groups (Duncan test, $p < 0.05$). # Values significantly different from corresponding saline group (Duncan test, $p < 0.05$).

Table 1 - [^3H]DAMGO binding in μ -opioid receptor.

Figure(s)

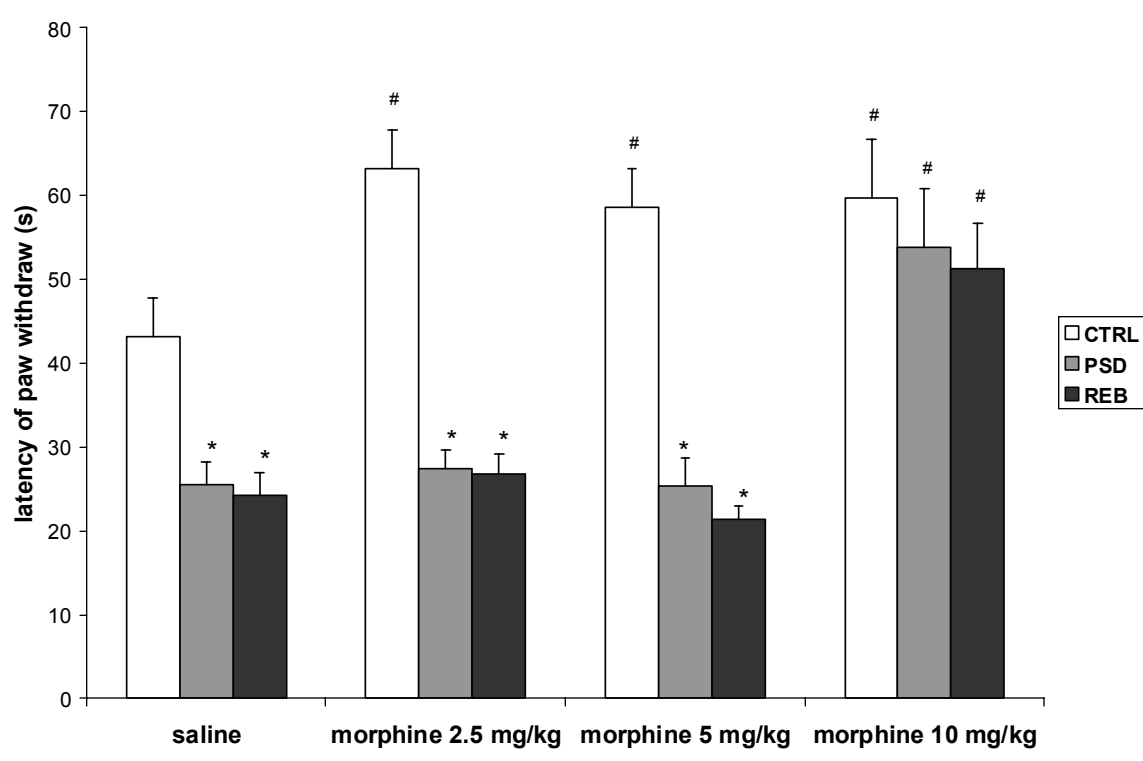


Table 1 - [³H]DAMGO binding in μ -opioid receptor.

Brain structure	CTRL (n=10)	PSD (n=10)	REB (n=10)
Cortex			
frontal association, II	0.98 \pm 0.11	1.06 \pm 0.14	1.08 \pm 0.11
frontal association, III	2.12 \pm 0.18	2.17 \pm 0.22	2.20 \pm 0.18
cingulate, area 1. I	1.28 \pm 0.16	1.26 \pm 0.13	1.32 \pm 0.12
cingulate, area 2. I	1.34 \pm 0.18	1.35 \pm 0.13	1.40 \pm 0.12
primary somatosensory, I	0.63 \pm 0.09	0.69 \pm 0.08	0.68 \pm 0.07
primary somatosensory, II	0.63 \pm 0.10	0.67 \pm 0.09	0.65 \pm 0.07
amygdala transition zone	5.39 \pm 0.47	5.90 \pm 0.58	6.11 \pm 0.57
Accumbens nucleus			
Core	2.02 \pm 0.21	2.33 \pm 0.32	2.43 \pm 0.22
Shell	2.86 \pm 0.26	2.81 \pm 0.31	2.97 \pm 0.23
Olfactory tubercle	1.09 \pm 0.13	1.14 \pm 0.12	1.10 \pm 0.11
Hippocampus			
CA1	0.65 \pm 0.10	0.73 \pm 0.10	0.68 \pm 0.09
CA3	1.44 \pm 0.14	1.35 \pm 0.16	1.48 \pm 0.16
Caudate putamen			
Anterior	2.26 \pm 0.23	2.41 \pm 0.35	2.44 \pm 0.26
Dorsomedial	1.34 \pm 0.15	1.50 \pm 0.19	1.58 \pm 0.16
Ventrolateral	1.64 \pm 0.19	1.82 \pm 0.24	1.95 \pm 0.28
Dorsolateral	1.17 \pm 0.16	1.41 \pm 0.18	1.41 \pm 0.18
Posterior	0.74 \pm 0.10	0.73 \pm 0.11	0.80 \pm 0.10
Septal area			
medial septal nucleus	1.90 \pm 0.20	1.67 \pm 0.17	1.83 \pm 0.17
Thalamic nuclei			
mediodorsal n., central part	2.05 \pm 0.18	1.87 \pm 0.19	1.98 \pm 0.19
mediodorsal n., lateral part	3.39 \pm 0.27	3.21 \pm 0.33	3.21 \pm 0.24
mediodorsal n., medial part	3.28 \pm 0.23	3.28 \pm 0.36	3.32 \pm 0.30
Hypothalamus			
lateral hypothalamic area	0.72 \pm 0.11	0.66 \pm 0.08	0.70 \pm 0.08
medial preoptic area	0.73 \pm 0.09	0.69 \pm 0.09	0.80 \pm 0.04
lateral preoptic area	0.93 \pm 0.12	0.78 \pm 0.10	0.76 \pm 0.08
ventromedial n.	0.84 \pm 0.07	0.99 \pm 0.11	0.96 \pm 0.10
Periaqueductal gray			
dorsomedial	0.62 \pm 0.09	0.71 \pm 0.08	0.73 \pm 0.07
dorsolateral	1.40 \pm 0.16	1.49 \pm 0.14	1.56 \pm 0.12
lateral	0.64 \pm 0.10	0.73 \pm 0.08	0.78 \pm 0.07
Substantia nigra			
medial part	4.32 \pm 0.35	3.96 \pm 0.33	4.47 \pm 0.39
compact part	1.16 \pm 0.16	1.24 \pm 0.14	1.28 \pm 0.12
reticular part, caudal	2.60 \pm 0.30	2.63 \pm 0.32	2.47 \pm 0.25
Ventral tegmental area	0.75 \pm 0.10	0.85 \pm 0.09	0.80 \pm 0.07
Locus coeruleus	2.77 \pm 0.25	3.05 \pm 0.29	2.88 \pm 0.15

Values are expressed as mean \pm S.E. in μ Ci/gT.
ANOVA one-way, $p > 0.05$

*** Suggested Reviewers**

C. H. Kennedy: craig.kennedy@vanderbilt.edu

S. Lautenbacher: Stefan.lautenbacher@ppp.uni-bamberg.de

S. Hakki Onen: hakki.onen@u-clermont1.fr